

Susanne Barbara Kamphausen

---

Die Rolle von kleinen nichtkodierenden RNAs  
bei der Kälteschockantwort und Kälteadaptation  
von *Listeria monocytogenes*



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Die Rolle von kleinen nichtkodierenden RNAs  
bei der Kälteschockantwort und Kälteadaptation  
von *Listeria monocytogenes***

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Susanne Barbara Kamphausen**

aus Wiesbaden

Gießen, 2016

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 27.10.2016



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Gattung <i>Listeria</i> .....	1
1.2	Pathogenität und Virulenz von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	3
1.2.1	Infektionszyklus und Virulenzfaktoren.....	3
1.2.2	Organisation und Regulation der Virulenzfaktoren .....	4
1.2.3	Listeriose.....	5
1.3	Kleine nichtkodierende RNAs .....	7
1.3.1	Einteilung von sRNAs .....	8
1.3.2	Entdeckung und Analyse von sRNAs.....	9
1.4	Kälteschockantwort und Kälteadaptation von Bakterien .....	12
1.4.1	Kälteschock.....	13
1.4.2	Überblick zur Kälteanpassung von Bakterien.....	13
1.4.3	Kälteanpassung von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
1.5	Ziel der Arbeit.....	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
2.1	Material.....	19
2.1.1	Bakterienstämme.....	19
2.1.2	Eukaryotische Zelllinie und Materialien der Zellkultur.....	20
2.1.3	Medien .....	21
2.1.4	Puffer.....	21

2.1.5	Lösungen.....	23
2.1.6	Größenstandards .....	24
2.1.7	Oligonukleotide.....	25
2.1.8	Kits.....	25
2.1.9	Geräte.....	26
2.1.10	Software .....	27
2.2	Methoden .....	28
2.2.1	Bakterienkulturen.....	28
2.2.2	RNA-Analyse.....	29
2.2.3	Proteinanalytik .....	34
2.2.4	Zellkultur.....	38
2.2.5	Infektion von <i>Galleria mellonella</i> .....	39
2.3	Statistische Analyse .....	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1	Wachstum .....	41
3.1.1	Wachstumskurven.....	41
3.1.2	Kälteschockversuch .....	49
3.1.3	Wachstum auf Platte .....	50
3.1.4	Schwärmverhalten auf Weichagar .....	54
3.2	RNA-Analyse .....	56
3.2.1	RT-PCR.....	56
3.2.2	Quantitative Realtime-PCR .....	59

3.3	Proteinanalytik .....	62
3.3.1	Zellwandproteine .....	63
3.3.2	Überstandsproteine .....	65
3.3.3	Zytoplasmatische Proteine .....	66
3.4	Zellkultur .....	67
3.5	Infektion von <i>Galleria mellonella</i> .....	69
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>72</b>
4.1	Wachstum der sRNA-Deletionsmutanten.....	72
4.2	RNA-Analyse .....	75
4.2.1	<i>rli44</i> .....	76
4.2.2	<i>rli47</i> .....	77
4.2.3	<i>rli78</i> .....	78
4.2.4	FMN.....	79
4.2.5	Haushalts-sRNAs <i>ssrA</i> , <i>ssrS</i> und <i>rnpB</i> .....	80
4.3	Proteinanalytik.....	82
4.4	Die sRNA <i>rli47</i> und weitere SigB-abhängige sRNAs.....	84
4.5	Zellkultur .....	87
4.6	Infektion von <i>Galleria mellonella</i> .....	88
4.7	Regulation von sRNAs bei Kälte.....	90
4.8	Fazit und Ausblick.....	91
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>93</b>

<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>108</b>
10.1	sRNA-Lokus und flankierende Gene ausgewählter untersuchter sRNAs ....	108
10.2	Target-Analyse für ausgewählte sRNAs .....	112
10.2.1	Target-Analyse mit TargetRNA2 .....	112
10.2.2	Target-Analyse mit RNA-Predator .....	126
<b>11</b>	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>140</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>141</b>
<b>13</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>142</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Listeria*

Die Gattung *Listeria* gehört zu den *Firmicutes*, zu denen auch die Gattungen *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* zählen. Ihnen ist ihr niedriger GC-Gehalt (Guanin und Cytosin) gemein; bei *Listeria monocytogenes* beträgt er 39 %. *Listeria* spp. sind grampositive, fakultativ anaerobe und intrazelluläre Stäbchen. Sie sind nicht-sporenbildend und besitzen keine Kapsel (Glaser et al., 2001; Vazquez-Boland et al., 2001).

Listerien haben die besondere Fähigkeit, auch bei extremen Umweltbedingungen überlebens- und wachstumsfähig zu sein. Dazu zählen hohe Salzkonzentrationen (bis 10 % NaCl), ein breiter pH-Bereich (pH 4,5-9) und eine große Temperaturspanne (0-45 °C) (Duffy et al., 1994). Dadurch erklärt sich, dass die Erreger weltweit ubiquitär in der Umwelt zu finden sind, so z. B. in der Erde, auf Pflanzen und in Abwässern. Entscheidender Ausgangspunkt für die potenzielle Kontamination von Lebensmitteln ist das Vorkommen in der Landwirtschaft. Hier finden sich Listerien u. a. in Tierfutter, verdorbener Silage oder Tierkot (Farber und Peterkin, 1991). Die optimale Wachstumstemperatur von Listerien liegt bei 30-37 °C. Aufgrund ihrer Fähigkeit auch bei Temperaturen <15 °C wachsen zu können, werden sie als psychrotolerant bezeichnet.

Bisher sind 17 Spezies der Gattung *Listeria* (L.) bekannt. Von den beiden pathogenen Spezies *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* ist nur *L. monocytogenes* sowohl human- als auch tierpathogen, *L. ivanovii* ist vorwiegend tierpathogen. *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* und *L. grayi* gelten als apathogen (Hain et al., 2007). 2010 wurden zwei weitere Spezies, *L. marthii* (Graves et al., 2010) und *L. rocourtiae*, in Österreich (Leclercq et al., 2010) beschrieben. Beide sind nach bisherigen Erkenntnissen apathogen. 2012 folgte die Isolierung von *L. weihenstephanensis* aus einem Teich in Bayern (Lang Halter et al., 2012). Die Entdeckung von *L. fleischmannii* wurde 2013 publiziert; die Listerien wurden in der Schweiz auf Käse isoliert (Bertsch et al., 2013). 2014 wurden fünf weitere apathogene Spezies in den USA identifiziert. Diese fanden sich in landwirtschaftlicher Umgebung und wurden *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* und *L. grandensis* genannt (den Bakker et al., 2014). Bei den

beiden zuletzt entdeckten Spezies handelt es sich um *L. booriae* und *L. newyorkensis* (Weller et al., 2015).

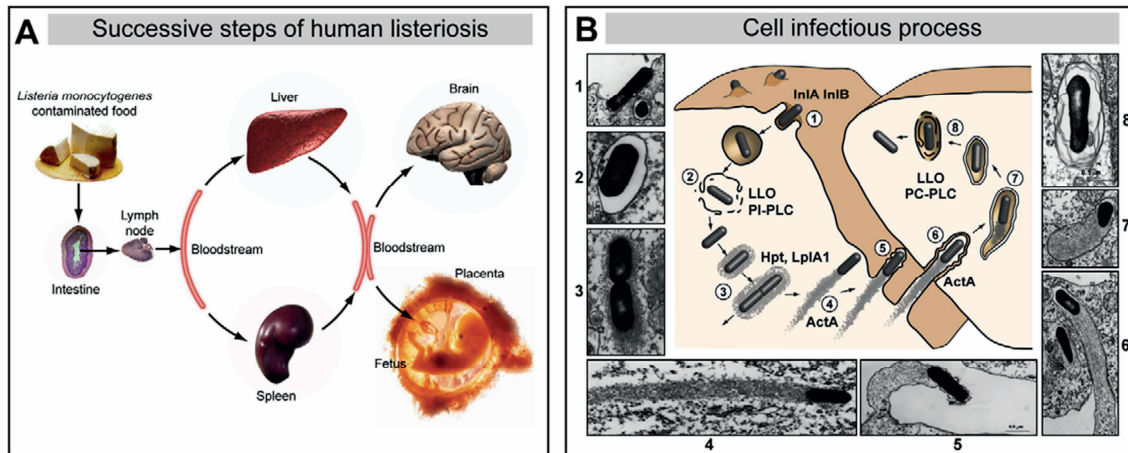
*Listeria monocytogenes* wurde erstmals 1926 durch Everitt George Dunne Murray et al. beschrieben. Er isolierte die Bakterien aus der Aszitesflüssigkeit von Kaninchen, bei denen sie eine Krankheit mit rasch progredientem und tödlichem Verlauf hervorgerufen hatten. Charakteristisch für diese Krankheit war eine Monozytose, weshalb Murray die Mikroorganismen als *Bacterium monocytogenes* bezeichnete (Murray et al., 1926). Pirie isolierte 1927 in Südafrika Bakterien aus der Leber von Wüstenrennmäusen, die sich als identisch mit den von Murray beschriebenen herausstellten. Zu Ehren des englischen Chirurgen Joseph Lister, einem Pionier auf dem Gebiet der aseptischen Chirurgie, wurde das Bakterium *Listerella hepatolitica* genannt. 1940 entstand daraus der heutige Name *Listeria monocytogenes* (Stavru et al., 2011). Die Initialen des Erstbeschreibers Murray finden sich heute noch in der Bezeichnung des Wildtyps *L. monocytogenes* EGD-e wieder.

Von der humanpathogenen Spezies *L. monocytogenes* gibt es 4 Linien mit 13 Serotypen (Seeliger 1986). Zur Linie I zählen die Serotypen 1/2b, 3b, 3c und 4b; zur Linie II die Serotypen 1/2a, 1/2c und 3a; zur Linie III die Serotypen 4a, 4b und 4c, und zur Linie IV die Serotypen 4a, 4b und 4c. Mit Erkrankungen beim Menschen assoziiert sind zum überwiegenden Teil die Linien I und II mit den Serotypen 1/2a (Linie II) sowie 1/2b und 4b (Linie I). Der Großteil der Erkrankungsfälle ist jedoch auf Linie 1 zurückzuführen, wovon wiederum der Serotyp 4b die größte Rolle für Infektionen bei Menschen spielt (Orsi et al., 2011).

Die vollständige Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGD-e Serovar 1/2a wurde 2001 von Glaser et al. publiziert. Das Genom besteht aus einem zirkulären Chromosom mit 2.944.528 Basenpaaren (Glaser et al., 2001).

## 1.2 Pathogenität und Virulenz von *Listeria monocytogenes*

### 1.2.1 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren



**Abb. 1.1 Listeriose.**

**(A) Aufeinanderfolgende Schritte der Listeriose beim Menschen.**

**(B) Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung der aufeinanderfolgenden Schritte des Zellinfektionsprozesses. Die Hauptvirulenzfaktoren sind gekennzeichnet.**

Mit Genehmigung des Verlags. (Cossart und Toledo-Arana, 2008)

Der Infektionszyklus, der zum Krankheitsbild der Listeriose führt, ist in Abb. 1.1 (A) dargestellt. Die Aufnahme von *L. monocytogenes* erfolgt oral über kontaminierte Lebensmittel. Die Bakterien passieren die Darmschranke und erreichen über Lymphe und Blutstrom Milz und Leber, wo sie sich in den Hepatozyten replizieren. Über hämatogene Streuung gelangen sie ins Gehirn und bei Schwangeren auch in die Plazenta (Cossart und Toledo-Arana, 2008). Sie besitzen also die Fähigkeit, gleich drei körpereigene Barrieren zu passieren: die Darmschranke, die Blut-Hirn-Schranke und die Plazentaschranke.

Den Infektionsprozess auf zellulärer Ebene mit den beteiligten Virulenzfaktoren zeigt Abb. 1.1 (B). Entscheidend für die Pathogenität und Virulenz ist die Fähigkeit von *L. monocytogenes*, intrazellulär zu überleben, sich zu vermehren und interzellulär fortzubewegen. Mithilfe zweier Oberflächenproteine, den Internalinen, binden die Bakterien zunächst an die Oberfläche der Darmepithelzellen und dringen über Rezeptor-vermittelte Endozytose vom Darmlumen aus in die Darmepithelzellen ein. Die Adhäsion erfolgt über Bindung der Internaline A und B (InlA, InlB) an Oberflächenproteine der Wirtszelle; InlA bindet an das Adhäsionsprotein E-Cadherin

und InlB bindet an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met. In Folge der Adhäsion induziert *L. monocytogenes* seine Aufnahme in die Zelle über einen „Zipper-Mechanismus“, der schließlich zur Internalisation der Bakterien in die Zelle führt. In der Wirtszelle werden sie von Makrophagen in Vakuolen eingeschlossen. Der Phagozytose können sie jedoch entgehen, indem sie sich mit Hilfe des porenbildenden Toxins Listeriolysin O (LLO) und den Phospholipasen PC-PLC und PI-PLC aus dem Phagosom befreien. Um sich im Zytosol vermehren zu können, müssen sie ihren Metabolismus an den der Wirtszelle anpassen. Dies ermöglichen verschiedene Gene wie *hpt* und *lplA1*, die für einen Hexosetransporter bzw. für eine Lipoat-Protein-Ligase kodieren (Cossart und Toledo-Arana, 2008). Es folgen Replikation und Ausbreitung. Dass die Bakterien sich intrazellulär fortbewegen und der Autophagie durch die zelleigene Abwehr entgehen können, verdanken sie ihrem Oberflächenprotein ActA. Damit „entern“ sie den Prozess der Aktinpolymerisation der Wirtszelle und bilden an einem Pol einen Aktinschweif aus. Mit diesem können sie sich nicht nur durch die Zelle bewegen, sondern entgehen - mit wirtszellspezifischen Proteinen als Bestandteil der Zelle getarnt - auch dem Autophagieprozess (Yoshikawa et al., 2009). Sie bewegen sich durch das Zytosol bis zur Wirtszellmembran fort, durchdringen diese nicht-lytisch und erreichen - eingeschlossen in eine sekundäre Vakuole - die Nachbarzelle. Die Doppelmembran dieser Vakuole lysieren sie mittels LLO und der Lecithinase PlcB. So liegen sie wieder frei im Zytosol vor und der Zyklus von Replikation und Ausbreitung kann von Neuem beginnen. Die Fähigkeit zur interzellulären Ausbreitung ermöglicht es *L. monocytogenes*, der humoralen Immunantwort des Wirts zu entkommen. Bei Immungesunden wird die weitere Ausbreitung im Körper durch die zelluläre Immunantwort unterbunden (Stavru et al., 2011).

### 1.2.2 Organisation und Regulation der Virulenzfaktoren

Eine geordnete Regulation der listeriellen Virulenzfaktoren ist notwendig, um einen Wirt zu infizieren und die Pathogenese einzuleiten. Die Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* sind in verschiedenen Clustern organisiert. Die Internaline InlA und InlB - notwendig für Adhäsion und Internalisation in die Wirtszelle - befinden sich auf dem sogenannten Internalin-Lokus. Sechs weitere, für das intrazelluläre Überleben der Bakterien essentielle Virulenzfaktoren, *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*, sind auf einem 9 kb großen chromosomalen Genabschnitt, der *Listeria* pathogenicity island 1 (LIPI-1), kodiert. Diese Pathogenitätsinsel LIPI-1 findet sich in *L. monocytogenes* und



*L. ivanovii*, nicht jedoch in den apathogenen Spezies. Eine Ausnahme stellt *L. seeligeri* dar. Diese enthält zwar die LIPI-1, die Virulenzgene werden aber wegen eines zusätzlichen offenen Leserahmens (ORF), der abweichend transkribiert wird, fehlerhaft exprimiert (Vazquez-Boland et al., 2001).

Der positive Regulationsfaktor A (PrfA) ist der zentrale Regulator der Expression von Virulenzgenen in *L. monocytogenes* wie *plcs* und *hly*. Das PrfA Regulon ist nur während der Infektion der Wirtszelle aktiviert, wird also außerhalb dieser nicht benötigt. PrfA ist ein Protein, das zur cAMP-Rezeptorprotein Fumarat-Nitrat-Reduktase Regulator Familie gehört. Das PrfA Regulon umfasst die LIPI-1, die die Virulenzfaktoren *hly*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *mpl* und *prfA* kodiert, sowie drei weitere chromosomale Loci; diese sind das *inlAB* Operon sowie die *inlC* und *hpt* Monocistron. Neben diesen neun Kernvirulenzgenen, die direkt von PrfA reguliert werden, wird die Expression 145 weiterer Gene in *L. monocytogenes* von PrfA wahrscheinlich indirekt beeinflusst (de las Heras, Aitor et al., 2011). Zur Rolle von PrfA als Thermosensor siehe Kapitel 1.3.1.

### 1.2.3 Listeriose

*Listeria* spp. zählen zu den fakultativ pathogenen Erregern. Durch Infektion mit *L. monocytogenes* kann beim Menschen eine Listeriose hervorgerufen werden. Die Inzidenz dieser Infektionskrankheit beträgt zwischen 0,2-0,8/100.000 Einwohner pro Jahr, die Mortalitätsrate 20-30 % (Farber und Peterkin, 1991; Vazquez-Boland et al., 2001). 2012 gab es in Deutschland 412 bestätigte Fälle (European Centre for Disease Prevention and Control, 2014). Der Großteil (99 %) der Infektionen mit *L. monocytogenes* ist auf kontaminierte Lebensmittel zurückzuführen (Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007).

Wie die o.g. Zahlen zeigen, handelt es sich bei der Listeriose um eine seltene, aber gefährliche und häufig tödlich verlaufende Infektionskrankheit. Das Vollbild der Listeriose variiert von Meningitis oder Meningoenzephalitis bis hin zu systemischen Infektionen mit Fieber und Sepsis. Gefährdet sind besonders Menschen mit einem geschwächten oder noch nicht voll ausgebildeten Immunsystem. Dazu zählen ältere Menschen über 65 Jahre, Neugeborene sowie immunsupprimierte Patienten, z. B. AIDS- oder Tumorkranke. Eine besondere Risikogruppe stellen Frauen in der Schwangerschaft dar. Während die Schwangere selbst meist wenn überhaupt nur unter

leichten grippeähnlichen Symptomen leidet, kann eine intrauterine Übertragung auf den Fötus zu schwerwiegenden Schädigungen, Frühgeburten und im schlimmsten Fall zum Abort führen. Auch perinatal ist eine Übertragung von der Mutter auf das Neugeborene möglich und hat oft schwere Krankheitsverläufe zur Folge (Vazquez-Boland et al., 2001). Anfang der 50er Jahre wurde von mehreren erkrankten Neugeborenen berichtet, die Granulome und Nekrosen vor allem in der Leber aufwiesen. Erdmann und Potel erkannten, dass eine Infektion mit *L. monocytogenes* der Auslöser dieser Granulomatosis infantiseptica war (Erdmann und Potel, 1953). Bei Immungesunden verläuft die Infektion dagegen in der Regel harmlos. Möglich sind ein vollständig asymptomatischer Verlauf oder leichte gastrointestinale Symptome wie Durchfall und Erbrechen, teilweise mit Fieber. Die Rate symptomloser Überträger beträgt 1-10 % (Hernandez-Milian und Payeras-Cifre, 2014).

Listeriose ist eine Lebensmittelinfektion. Der Zusammenhang zwischen kontaminierten Lebensmitteln und einer Erkrankung wurde nach dem Auftreten mehrerer Krankheitsfälle 1981 in Halifax, Kanada, die auf den Verzehr von Krautsalat zurückgeführt werden konnten, publiziert (Schlech, WF 3rd, et. al., 1983). Eine Kontamination mit *L. monocytogenes* kann primär durch infizierte Kühe oder durch Erreger in der Erde, oder sekundär während des Produktionsprozesses erfolgen. Kontaminationen finden sich vor allem auf kalten, verzehrfertigen Lebensmitteln wie abgepackten Salaten und Sandwiches, oder auch auf Rohmilchprodukten, Weichkäse und Räucherlachs (Hof, 2003). Gefährlich ist hierbei besonders, dass sich die Bakterien auch bei niedrigen Temperaturen vermehren können, so dass die Lagerung von Lebensmitteln im Kühlschrank keinen sicheren Schutz vor einer Ausbreitung der Erreger bietet (Robert Koch-Institut).

Zur Antibiotikatherapie der Listeriose sind die Aminopenicilline Amoxicillin oder Ampicillin hochdosiert in Kombination mit einem Aminoglykosid Mittel der ersten Wahl. Als zweite Wahl kommt Cotrimoxazol in Frage. Die Resistenzlage ist zwar (aktuell noch) gut, jedoch wird trotzdem häufig ein Nichtansprechen auf die Therapie beobachtet. Ursache dafür sind zum einen die intrazelluläre Lebensweise des Erregers und dessen Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, zum anderen das durch Vorerkrankungen bzw. altersbedingt geschwächte Immunsystem des Patienten sowie eine auf Grund der unspezifischen Symptome oft erst spät gestellte Diagnose (Robert Koch-Institut). Zu bedenken ist auch die Entwicklung zukünftiger Resistenzen als Folge

des zunehmenden Einsatzes von Antibiotika in Krankenhäusern, aber auch in der Massentierhaltung. Eine Impfung gegen Listeriose gibt es bis jetzt nicht. Eine umso größere Rolle kommt daher der Prävention und der Entwicklung von wirksamen Präventionsmaßnahmen zu. Wenn auch die Kontamination von Lebensmitteln mit *L. monocytogenes* nicht vollständig verhindert werden kann, so würde eine Reduktion der Keimzahl bzw. das Verhindern der weiteren Vermehrung die Krankheitsfälle schon deutlich senken. Wichtig ist außerdem die Aufklärung von Risikogruppen über die Infektionsgefahr durch den Verzehr bestimmter Lebensmittel.

### 1.3 Kleine nichtkodierende RNAs

Small RNAs (sRNAs) oder small non-coding RNAs (sncRNAs) sind kleine nichtkodierende regulatorische RNA-Moleküle in Bakterien (in dieser Arbeit als sRNAs abgekürzt). Sie haben definitionsgemäß eine Größe von 50-500 Nukleotiden und kodieren im Gegensatz zu mRNA nicht für Proteine. Sie regulieren posttranskriptional die Genexpression und ermöglichen es dem Bakterium durch verschiedene Mechanismen, sich an die Umwelt und deren Veränderungen anzupassen. Die Wirkungsweise von sRNAs erfolgt auf zwei Arten: sie können zum einen an sogenannte Ziel-mRNA (Targets) mittels Basenpaarung binden und durch so gebildete RNA/RNA-Komplexe deren Translation hemmen bzw. aktivieren oder Auswirkungen auf die Stabilität haben. Zum anderen können sie an Proteine binden und so deren Aktivität beeinflussen. Insgesamt ist die Wirkung von sRNAs auf die Transkription überwiegend inhibierend, seltener aktivierend (Repoila und Darfeuille, 2009). Eine Sonderform, die Riboswitches, erzielt ihre regulatorische Funktion durch Änderung der RNA-Konformation (Repoila und Darfeuille, 2009). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) sind RNAs, die aus kurzen, sich wiederholenden Sequenzen bestehen, die sich mit Spacern abwechseln. Sie sorgen für Resistenz gegenüber Bakteriophagen und verhindern die Plasmidkonjugation (Waters und Storz, 2009).

Das Analogon zu sRNAs in Prokaryonten sind short interfering RNAs (siRNAs) und microRNAs (mi-RNAs) in Eukaryonten.

Nachdem sRNAs jahrelang mehr zufällig entdeckt wurden, werden sie seit 2001 systematisch detektiert. Das Ausmaß von Anzahl und Bedeutung wurde erst nach und

nach deutlich. Eine Vorreiterrolle kommt dem gramnegativen Bakterium *E. coli* zu. Erst später rückten auch grampositive Bakterien in den Fokus der Untersuchungen.

### 1.3.1 Einteilung von sRNAs

sRNAs lassen sich nach mehreren Gesichtspunkten einteilen, so z. B. wie oben beschrieben nach der Wirkungsweise. Im Folgenden liegt der Fokus auf den sRNAs, die ihre Wirkung über Bindung an mRNA entfalten.

Bei dieser Gruppe von sRNAs, die RNA/RNA-Komplexe bilden, unterscheidet man je nach Position *cis*- von *trans*-regulatorischen sRNAs. *Cis*-kodierte sRNAs befinden sich auf dem gegenüberliegenden Strang der mRNA die sie regulieren. Sie weisen ein hohes Maß an Komplementarität mit ihren Ziel-mRNAs auf und binden daher auch nur ein bestimmtes Target. Zu den *cis*-regulatorischen RNA-Elementen zählen auch die 5' UTRs mit Riboswitches, die im folgenden Absatz beschrieben werden. *Trans*-kodierte sRNAs sind auf einer anderen Stelle des Genoms kodiert als ihre Ziel-mRNA. Sie sind nur teilweise komplementär zu ihrem Target und können deshalb mit verschiedenen mRNAs partielle Doppelstränge bilden (Brantl, 2008; Gripenland et al., 2010). Typischerweise sind *trans*-kodierte sRNAs dadurch gekennzeichnet, dass sie sich im Bereich zwischen zwei Genen befinden, der so genannten intergenischen Region (IGR). Die Nomenklatur erfolgt durch Angabe der beiden Gene, z. B. *lmo2141/lmo2142* bzw. meist nur dem 5' gelegenen Gen. Zusätzlich sind die sRNAs für *L. monocytogenes* durchnummeriert und werden als *rli* (RNA in *Listeria*) bezeichnet. Neben diesen intergenisch gelegenen sRNAs gibt es weitere, die auf dem gegenüberliegenden Strang der mRNA, die sie regulieren, kodiert sind. Diese Gruppe wird als antisense RNAs (asRNAs) bezeichnet. Zuletzt wurde die Entdeckung von neun bisher nicht bekannten asRNAs in *L. monocytogenes* publiziert (Behrens et al., 2014). Weitere lange nichtkodierende asRNAs wurden von Wehner et al. identifiziert (Wehner et al., 2014).

Riboswitches beeinflussen die Genexpression im Gegensatz zu „herkömmlichen“ sRNAs nicht durch Bindung an die Ziel-mRNA, sondern durch Änderung ihrer Konformation. Sie befinden sich meist in der 5' UTR als Teil der mRNA, die sie regulieren, sind also *cis*-kodiert. Als 5' UTR bezeichnet man den untranslatierten Randbereich am 5'-Ende einer mRNA. Hier werden keine Proteine kodiert, sondern meist regulatorische Funktionen erfüllt. Die Konformationsänderung eines Riboswitches erfolgt als Reaktion auf veränderte Metaboliten oder durch

Ligandenbindung und hat eine Änderung der Expression der nachfolgenden Genabschnitte zur Folge. Riboswitches bestehen aus 2 Teilen, der Aptamer-Region, die den Liganden bindet und der Expressionsplattform. Diese Plattform ändert ihre Konformation in Abhängigkeit von der Bindung eines Liganden und reguliert so die Transkription oder Translation meistens durch Inaktivierung, seltener durch Aktivierung der Genexpression (Waters und Storz, 2009). Ein Beispiel für einen Metaboliten-abhängigen Riboswitch ist der FMN-Riboswitch, auch als *RFN*-Element bezeichnet. Er befindet sich in der 5' UTR der mRNA, die für FMN (Flavinmononukleotid) kodiert. Wie in *B. subtilis* gezeigt werden konnte, fungiert er als FMN-bindendes Aptamer und reguliert so die Genexpression (Winkler et al., 2002). Neuere Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass eine Unterscheidung zwischen Riboswitches und mRNA-bindenden sRNAs nicht immer eindeutig möglich ist. So konnte z. B. für den SAM-Riboswitch (S-Adenosylmethionin) eine duale regulatorische Funktion nachgewiesen werden: er kann einerseits als Riboswitch in *cis* agieren, andererseits aber auch in *trans* an Ziel-mRNA binden (Loh et al., 2009).

Neben Riboswitches können 5' UTRs auch Thermosensoren und pH-Sensoren enthalten, die eine ähnliche Wirkungsweise wie Riboswitches haben und auf Umweltsignale reagieren. In *L. monocytogenes* ist ein solcher Thermosensor identifiziert, der die Translation des Virulenzfaktors PrfA reguliert. Bei 30 °C wird die Translation durch eine Konformationsänderung der 5' UTR von PrfA inhibiert, indem die Shine-Dalgarno-Sequenz maskiert wird. Bei 37 °C bleibt die Translation unbeeinflusst (Johansson et al., 2002).

Häufig ist eine Interaktion mit Proteinen für die Regulation durch sRNAs nötig. Das RNA-Chaperon Hfq ist normalerweise nur in die Virulenz gramnegativer Bakterien involviert. Die Beteiligung an der Regulation von Virulenz und Pathogenität in *L. monocytogenes* durch sRNAs, besonders *trans*-kodierte sRNAs, stellt eine Ausnahme dar (Gripenland et al., 2010).

### 1.3.2 Entdeckung und Analyse von sRNAs

Die Existenz von sRNAs ist schon seit über 30 Jahren bekannt. Allerdings wurde ihnen lange Zeit kaum Aufmerksamkeit geschenkt und sie wurden, wenn überhaupt, nur zufällig entdeckt. Erst seit 2001 wurde die Suche nach sRNAs systematisiert, einzelne Kandidaten näher charakterisiert und so erste Erkenntnisse über ihre Rolle in

Pathogenität und Virulenz von Bakterien gewonnen. Durch die Kombination von computergestützten Verfahren und experimentellen Techniken stieg die Zahl an identifizierten sRNAs in den letzten Jahren rapide an, die Suche ist jedoch längst noch nicht abgeschlossen. Immer neue Bereiche erschließen sich, in denen sRNAs involviert sind, und vervollständigen so das Bild von sRNAs nach und nach. Außerdem ist es mittlerweile möglich mit speziellen Computerprogrammen, wie z. B. RNAPredator (Eggenhofer et al., 2011) oder TargetRNA2 (Kery et al., 2014), die Zielstrukturen von sRNAs zu identifizieren.

Eine der ersten sRNAs wurde 1981 von Stougaard et al. beschrieben. Es handelt sich um ein ~108 Nukleotide großes RNA-Molekül, das die ColE1 Plasmidreplikation blockiert (Stougaard et al., 1981). In *L. monocytogenes* wurde die erste sRNA 1999 entdeckt: beschrieben wurde die Haushalts-sRNA 4.5S, die 276 Nukleotide groß ist und an SRP (Signal Recognition Particle) bindet (Barry et al., 1999). Weitere 20 sRNAs wurden durch Co-Immunopräzipitation und durch Northern Blot entdeckt: Drei sRNAs wurden durch Co-Immunopräzipitation mit Hfq entdeckt, einem Protein, das direkt sowohl an sRNA als auch an die Ziel-mRNA bindet. Dies kann als der erste systematische Ansatz betrachtet werden, sRNAs in *L. monocytogenes* zu identifizieren (Christiansen et al., 2006). Christiansen et al. konnten zeigen, dass es sRNAs gibt, die mit Hilfe des Chaperons Hfq an mRNA binden. Die Beobachtung, dass eine Mutante, in der das Gen *hfq* deletiert wurde, abgeschwächte Virulenz zeigte, gibt Hinweise darauf, dass die bindenden sRNAs an der Virulenz der Bakterien ursächlich mitbeteiligt sind (Christiansen et al., 2004). Zwölf weitere sRNAs wurden mit Northern Blot-Analysen identifiziert, dabei handelt es sich um *rliA-rliI*, *ssrS*, *ssrA*, *rnpB*. Für drei davon, nämlich *rliB*, *rliE* und *rliI*, konnten die Targets identifiziert werden (Mandin et al., 2007). 2008 publizierten Nielsen et al. die Entdeckung der sRNAs *SbrA-SbrD*. Es konnte gezeigt werden, dass *SbrA* sigB-abhängig ist (Nielsen et al., 2008).

Zu diesen 21 sRNAs kam in den darauffolgenden Jahren dank neuer computergestützter Hochdurchsatzverfahren wie Tiling Microarray und RNA-Sequencing (RNA-Seq) eine große Zahl weiterer sRNAs hinzu. So sind zum jetzigen Zeitpunkt 155 sRNAs in *L. monocytogenes* bekannt (Bécavin et al., 2014), die im Wesentlichen in vier großen Studien entdeckt wurden. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

Toledo-Arana et al. analysierten mit Hilfe von Tiling Arrays die Transkription des gesamten Genoms von *L. monocytogenes* und entdeckten 50 sRNAs sowie weitere asRNAs (einschließlich der bereits bekannten) und gewannen neue Erkenntnisse über Riboswitches. Sie führten Untersuchungen bei 37 °C im Vergleich zu drei verschiedenen Wachstumsbedingungen, in der stationären Phase, bei Hypoxie und bei niedriger Temperatur (in dieser Studie als 30 °C definiert), durch. Sie berichteten von 29 neuen sRNAs (*rli22-rli50*). Weitere 53 *cis*-regulatorische RNAs, darunter 40 Riboswitches, wurden identifiziert und erhöhten die Gesamtzahl der in dieser Studie entdeckten regulatorischen RNA-Elemente auf 82. Des Weiteren wurde entdeckt, dass einige der sRNAs in der apathogenen Spezies *L. innocua* nicht vorhanden sind. Im Zusammenhang mit sRNAs und niedriger Temperatur konnte bei drei der neu entdeckten sRNAs eine Veränderung in der Genexpression beobachtet werden: die sRNA *rli30* war bei 30 °C dreifach herunterreguliert, die sRNAs *rli43* und *rli44* waren dreifach hochreguliert (Toledo-Arana et al., 2009).

Die Studie von Oliver et al. bestätigte große Teile der Ergebnisse von Toledo-Arana et al. anhand von RNA-Seq. Es wurden 67 sRNAs beschrieben, davon sieben bislang unbekannte (*rli64-rli70*). Die übrigen 60 sRNAs deckten sich mit den zuvor von Toledo-Arana, Nielsen, Mandin und Christiansen beschriebenen. Dass die restlichen von Toledo-Arana et al. beschriebenen sRNAs in dieser Studie nicht bestätigt werden konnten, ist auf die unterschiedlichen Methoden zurückzuführen und liegt daran, dass das von Oliver et al. verwendete RNA-Seq Protokoll antisense RNAs nicht einschließt (Oliver et al., 2009). Diese Lücke konnte von Mraheil et al. geschlossen werden. In dieser Studie wurden mithilfe von RNA-Seq 150 sRNAs inklusive antisense RNAs identifiziert (71 davon bisher nicht beschrieben), von denen 29 spezifisch intrazellulär exprimiert werden. Der Fokus dieser Studie lag auf der Detektion von sRNAs, die bei intrazellulärem Wachstum exprimiert werden. Drei sRNA-Kandidaten, *rli31*, *rli33-I* und *rli50\**, als Vertreter von intrazellulär stark hochregulierten sRNAs, wurden näher untersucht. Die Deletionsmutanten zeigten abgeschwächtes Wachstum und Virulenz in Makrophagen und im Insekten- sowie Mausmodell (Mraheil et al., 2011).

Einen Vergleich zwischen dem nichtkodierenden Genom von *L. monocytogenes* und der apathogenen Spezies *L. innocua* lieferten 2012 Wurtzel et al. Sie publizierten die Entdeckung von 33 bisher nicht bekannten sRNAs in *L. monocytogenes* (Wurtzel et al., 2012).

Trotz dieser rasanten quantitativen Entwicklung die Zahl identifizierter sRNAs in *L. monocytogenes* betreffend bleibt über deren Funktion noch vieles im Unklaren. Erst nach und nach erschließen sich immer neue Bereiche, in denen sRNAs als Regulatoren in Bakterien eine Rolle spielen. Dazu zählen u.a. der Einfluss von sRNAs auf Virulenz und Pathogenität oder die Adaptation und das Überleben bei extremen Umweltbedingungen bzw. Umweltveränderungen. Die Rolle, die sRNAs bei der Anpassung an verschiedenste Stressbedingungen wie Veränderungen von Temperatur, Metaboliten und pH-Wert spielen, haben Hoe et al. zusammengefasst (Hoe et al., 2013). Nur für wenige sRNAs konnte bisher eine spezifische Rolle in der Virulenz oder eine Bedeutung für das Überleben nachgewiesen werden (Toledo-Arana et al., 2009; Mraheil et al., 2011).

## 1.4 Kälteschockantwort und Kälteadaptation von Bakterien

Starke Temperaturänderungen, insbesondere sehr plötzliche in Form von Hitze- oder Kälteschock, haben einen großen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Bakterien. Die Hitzeschockantwort von Bakterien ist im Gegensatz zur Kälteschockantwort bereits ausgiebig erforscht. Während ein Hitzeschock auf Bakterien einen erheblichen und klar definierten Zellschaden z. B. in Form von Denaturierung und Entfaltung von Proteinen ausübt, sind die Folgen eines Kälteschocks und besonders die Kälteschockantwort nicht so einheitlich. Nichtsdestotrotz sind diese von erheblicher Bedeutung, nicht zuletzt für die Lebensmittelindustrie. Das Kühlen und Einfrieren von Lebensmitteln wird als Schutz vor Kontamination bzw. Vermehrung von Keimen eingesetzt. Betrachtet man jedoch *L. monocytogenes*, das bei Kühlschranktemperaturen um die 4 °C nicht nur überleben, sondern sich auch vermehren kann, wird das damit einhergehende Gesundheitsrisiko deutlich. Es ist also von großer Bedeutung, die Mechanismen zu untersuchen, die es dem Bakterium ermöglichen, sich diesen niedrigen Temperaturen anzupassen, und daraus Maßnahmen abzuleiten, die das Wachstum auf gekühlten Lebensmitteln verhindern oder zumindest eindämmen können.

Was ist also bisher zur Kälteanpassung von Bakterien im Allgemeinen und *L. monocytogenes* im Speziellen bekannt?



### 1.4.1 Kälteschock

In dieser Arbeit wird ein Aspekt der Kälteschockantwort von *L. monocytogenes* untersucht. Um einen möglichst deutlichen Effekt in der Anpassungsreaktion der Bakterien beobachten zu können, ist die Differenz zwischen Ausgangs- und Endtemperatur wichtiger als die absolute Endtemperatur. Je größer der Temperaturunterschied, desto stärker fällt die zu erwartende Anpassungsreaktion der Bakterien aus (Jones et al., 1992). In dieser Arbeit wird als Definition für Kälteschock ein abrupter Temperaturabfall von der für *L. monocytogenes* optimalen Wachstumstemperatur von 37 auf 15 °C zu Grunde gelegt. Dies hat sich in den letzten Jahren für mesophile Bakterien als standardisierter Kälteschock unter Laborbedingungen etabliert (Weber und Marahiel, 2002; Barria et al., 2013).

Im Anschluss an einen plötzlichen Temperaturabfall lassen sich drei Phasen der Anpassungsreaktion von Bakterien beobachten: Unmittelbar auf den Kälteschock folgt ein vorübergehender kompletter Wachstumsstopp. Er hält 3-6 h an, für das mesophile Bakterium *E. coli* werden 4 h angegeben (Barria et al., 2013). Es folgt eine Akklimatisationsphase mit verringerter Synthese der Proteine, die bei 37 °C exprimiert werden, während die Synthese von Kälteschockproteinen (Cold Shock Proteins, Csps), die bei 37 °C reprimiert sind, nun induziert wird. In der sich anschließenden Adaptationsphase erreichen die Expressionslevel der Proteine wieder ihr Ausgangsniveau (Thieringer et al., 1998).

### 1.4.2 Überblick zur Kälteanpassung von Bakterien

Werden Bakterien niedrigen Temperaturen ausgesetzt, so finden zahlreiche Veränderungen statt, die Probleme nach sich ziehen. Wesentliche Veränderungen sind (i) eine herabgesetzte Membranfluidität, die die Aufnahme von Nährstoffen behindert, (ii) ein verstärktes Coiling der Superhelices der DNA, das die Fähigkeit zur Replikation und Transkription einschränkt, (iii) die Stabilisierung von Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren, die die Effizienz der Translation und Transkription von mRNA beeinflusst, (iv) eine ineffiziente Proteinfaltung, (v) reduzierte Enzymaktivität sowie (vi) eine eingeschränkte Funktion von Ribosomen (Phadtare, 2004; Chan und Wiedmann, 2008).

Um auf den Temperaturabfall überhaupt reagieren zu können, muss die Zelle die Veränderung zunächst spüren. Dies wird im Wesentlichen dort wahrgenommen, wo die temperaturbedingten Veränderungen auch stattfinden, im Einzelnen in der Zellmembran, in Nukleinsäuren und in Ribosomen (Phadtare, 2004).

Der Begriff Kälteschockantwort fasst verschiedene Mechanismen zusammen, die Bakterien aktivieren, um auf diese Veränderungen zu reagieren. Nur so können sie bei niedrigen Temperaturen überhaupt überleben. Von entscheidender Bedeutung für die Adaptation von Bakterien an die veränderten Umweltbedingungen ist es zum einen, die Membranzusammensetzung so zu verändern, dass die Fluidität wieder erhöht wird. Dies erfolgt durch eine Anpassung der Fettsäure-Zusammensetzung der Zellmembran. Zum anderen muss mit veränderter Translation und Transkription reagiert werden (Thieringer et al., 1998; Barria et al., 2013). Weitere beschriebene Mechanismen sind die Aktivierung von Csps und Caps, also die Induktion von Kälteschockproteinen und Kälteakklimatisationsproteinen, die für *E. coli* und *B. subtilis* ausgiebig erforscht sind. Weiterhin zu nennen sind die Induktion des Desaturase-Systems, Veränderungen im RNA-Metabolismus, die Transkription-Antitermination Funktion von CspA Homologen, die Kälteschock-Induktion von Chaperonen sowie die Synthese von Trehalose (Schumann et al., 2008).

Als Beispiel für die Kälteschockantwort eines gramnegativen Bakteriums zählt die von *E. coli* zu den mit am besten untersuchten. Im Fokus der Untersuchungen stehen die Kälteschockproteine. So wurde das erste Kälteschockprotein, CspA, in *E. coli* entdeckt. Es liegt in neun Homologen vor, CspA-CspI, von denen vier, CspA, CspB, CspG und CspL, kälteinduziert sind (Thieringer et al., 1998). Für CspA konnte eine Funktion als RNA-Chaperon nachgewiesen werden. Durch Bindung von CspA an die RNA kann die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert und so die Translation der mRNA auch bei niedrigen Temperaturen ermöglicht werden (Weining et al., 1997). In *E. coli* werden die Kälteschockproteine in zwei Klassen eingeteilt: Klasse I enthält die Csps, die bei 37 °C nicht oder kaum exprimiert werden und bei denen ein deutlicher Anstieg des Expressionslevels nach Kälteschock beobachtet wurde. Die Csps in Klasse II hingegen werden auch bei 37 °C induziert und es kommt nur zu einem leichten Anstieg des Expressionslevels nach Kälteschock (Thieringer et al., 1998).

Als ein Vertreter grampositiver Bakterien gilt *B. subtilis* als Modellorganismus und ist im Hinblick auf seine Kälteschockantwort gut untersucht. Um die Membranfluidität wiederherzustellen, stehen zwei Mechanismen zur Verfügung. Dies ist zum einen die Neusynthese von gesättigten anteiso-C<sub>15</sub>- und C<sub>17</sub>-Fettsäuren für die langfristige Kälteadaptation und eine vorübergehende Induktion des Fettsäuredesaturase-Gens *des*, das zur Synthese aller vier in *B. subtilis* bekannten ungesättigten Fettsäuren führt. Dieses Gen ermöglicht es, die Fettsäurezusammensetzung der Membran zeitnah zu verändern und erlaubt so eine schnelle Kälteschockanpassung (Klein et al., 1999; Weber et al., 2001). Zum anderen spielen die kälteinduzierten Proteine CspB-CspD, drei CspA-Homologe aus der Kälteschockprotein-Familie, eine wichtige Rolle. Interessanterweise kommt es bei *B. subtilis* im Gegensatz zu anderen Bakterien wie *E. coli* oder *L. monocytogenes* nach dem Kälteschock nicht zu einem kompletten Wachstumsstopp, sondern nur zu einer verlangsamten Wachstumsrate (Weber und Marahiel, 2002).

#### 1.4.3 Kälteanpassung von *Listeria monocytogenes*

Im Gegensatz zu anderen lebensmittelassoziierten Erregern wie Salmonellen, bei denen bereits eine geringe Infektionsdosis ausreicht, ist diese bei *L. monocytogenes* sehr hoch. Wenn man davon ausgeht, dass die ursprüngliche Kontamination von Lebensmitteln nach der Produktion nur gering ist, wird deutlich, dass die Vermehrung der Bakterien während der anschließenden Lagerung im Kühlschrank das eigentliche Problem ist. Während das Wachstum bei Temperaturen unter 4 °C deutlich verlangsamt und die lag-Phase verlängert ist, steigt die Wachstumsrate oberhalb von 4 °C wieder deutlich an und die lag-Phase verkürzt sich. Bei durchschnittlichen Kühlschranktemperaturen von 7-10 °C kann bei einer bestehenden Kontamination im Kühlschrank eine ausreichende Zahl an Erregern entstehen um eine Infektion hervorzurufen (Chan und Wiedmann, 2008).

In *L. monocytogenes* sind eine Reihe von Mechanismen zur Kälteanpassung untersucht und beschrieben. So werden verschiedene Kälteschockproteine induziert. Weiterhin beeinflussen DEAD/DEAH Box RNA-Helikasen die Translation von Genen bei Kälte; in *L. monocytogenes* finden sich im Genom mindestens 22 Proteine mit DEAD/DEAH Box Motiven. Dass diese eine Rolle beim Kältewachstum spielen, zeigt eine Studie von Chan et al. Drei Gene, die für DEAD Boxen kodieren, haben bei 4 °C höhere Expressionslevel als bei 37 °C (Chan et al., 2007b). Andere Mechanismen dienen der

Modifikation der Membranfluidität. ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter erleichtern die Aufnahme von Osmolyten. Weitere Untersuchungen beziehen sich auf den Oligopeptide Permease Mediated Peptide Transport, Ferritin, den (p)ppGpp Metabolismus sowie weitere Proteine, kodiert durch die Gene *ltrA*, *ltrB*, *ltrC* und *fri* und deren Einfluss auf das Wachstum bei niedrigen Temperaturen (Chan und Wiedmann, 2008).

Im Folgenden werden zwei der oben genannten Punkte, die Kältschockproteine und die Membranfluidität, genauer beleuchtet.

Kälteschockproteine sind vor allem in *E. coli* und *B. subtilis* gut untersucht. Je nach Autor wird bei den Proteinen, die nach einem Kälteschock induziert werden, zwischen Kälteschockproteinen (Thieringer et al., 1998) und Kälteakklimatisationsproteinen unterschieden bzw. die Caps als Untergruppe der Csps gesehen. Csps werden nur unmittelbar nach einem Kälteschock exprimiert und dann auch nur vorübergehend, während Caps nicht ausschließlich nach Kälteschock und länger anhaltend exprimiert werden. In *L. monocytogenes* sind drei kleine, hoch homologe Proteine aus der Familie der Kälteschockproteine bekannt: CspA, CspB, CspD. Es hat sich herausgestellt, dass diese Proteine zum Wachstum der Bakterien bei 37 °C entbehrlich sind, bei Kälte und osmotischem Stress jedoch benötigt werden. In Bezug auf das Wachstum nach Kälteschock wurde gezeigt, dass CspA dabei die größte Bedeutung zukommt, gefolgt von CspD und CspB (Schmid et al., 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Csps auch für die Invasion in Wirtszellen benötigt werden (Loepfe et al., 2010).

Bakterien haben drei Möglichkeiten, die Membranfluidität durch Veränderungen an den Fettsäuren zu erhöhen: (i) die Verzweigung der Fettsäuren kann von *iso*- zu *anteiso* verändert werden, (ii) die Kettenlänge wird zu Gunsten niedrigkettiger Fettsäuren angepasst und (iii) der Grad an ungesättigten Fettsäuren kann erhöht werden. Alle diese Veränderungen führen schließlich dazu, den Schmelzpunkt der Fettsäuren zu senken und so die Membranfluidität auch bei niedrigen Temperaturen aufrechtzuhalten (Suutari und Laakso, 1994). Untersuchungen in *L. monocytogenes* bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen von 45 bis 5 °C zeigten zwei Arten der Anpassung an niedrige Temperaturen: eine Verkürzung der Kettenlänge der Fettsäuren und eine veränderte Verzweigung von *iso* zu *anteiso* beim Temperaturshift von 20 auf 5 °C. Des Weiteren ergab der Vergleich von kältesensitiven Mutanten mit dem Elternstrang, dass die

kältesensitiven Mutanten deutlich weniger verzweigtkettige ungradzahlige Fettsäuren besaßen. Als dominierend bei niedrigen Temperaturen stellte sich die *anteiso*-verzweigte Fettsäure C<sub>15:0</sub> heraus. In der Zusammenschau mit weiteren Studienergebnissen schlossen die Autoren daraus, dass die Fettsäure a-C<sub>15:0</sub> eine kritische Rolle beim Kältewachstum von *L. monocytogenes* spielt. Im Gegensatz zu *B. subtilis* konnte in *L. monocytogenes* keine Fettsäure-Desaturase nachgewiesen werden (Annous et al., 1997).

Einen genomweiten Microarray-basierten Ansatz zur Analyse des gesamten Regulons von *L. monocytogenes* bei Kälte lieferten Chan et al. Sie verglichen die Genexpression bei 4 und bei 37 °C in der log-Phase und in der stationären Phase. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die beiden RNA-Helikasen *lmo0866* und *lmo1722* bei 4 °C sowohl in der log-Phase als auch in der stationären Phase im Vergleich zu 37 °C signifikant hochreguliert waren (Chan et al., 2007b).

## 1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob kleine nichtkodierende regulatorische RNA-Moleküle in *L. monocytogenes* das Überleben oder die Virulenz der Bakterien nach einem Kälteschock beeinflussen. Im Rahmen des europäischen sRNAomics-Verbundprojektes wird der Einfluss von sRNAs des humanpathogenen Bakteriums *L. monocytogenes* u. a. in Bezug auf Pathogenität und Virulenz untersucht. Außerdem gibt es viele Arbeiten, die verschiedene Mechanismen der Kälteschockantwort von *L. monocytogenes* untersuchen. Aus der Kombination dieser beiden hochaktuellen Themen ergibt sich die Frage, ob sRNAs bei der Kälteschockantwort von *L. monocytogenes* eine Rolle spielen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Detektion und Charakterisierung potentieller sRNAs, die in die Kälteschockantwort von *L. monocytogenes* involviert sind. Dazu werden bakterielle sRNA-Transkriptionsprofile von *L. monocytogenes* bei 37 °C und zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem Kälteschock von 37 auf 15 °C ausgewertet. Besonders stark regulierte sRNAs werden anhand von chromosomalen Deletionsmutanten zunächst in-vitro in Wachstumsversuchen unter verschiedenen Bedingungen, anschließend in-vivo in Infektionsversuchen in Dickdarm-Zellkulturen und im Insektenmodell mit Larven der Wachsmotte *Galleria mellonella* näher charakterisiert.

Die wichtigste Infektionsquelle für *L. monocytogenes* sind kontaminierte Lebensmittel. Da *L. monocytogenes* bei Temperaturen zwischen 0 und 45 °C wachsen kann, ist es in der Lage, sich auf Lebensmitteln bei niedrigen Temperaturen wie z. B. im Kühlschrank zu vermehren und bei Immunsupprimierten die lebensbedrohliche Lebensmittelinfektion Listeriose zu verursachen. Sowohl aus mikrobiologischer und humanmedizinischer Sicht als auch für die Lebensmittelindustrie ist die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die es den Bakterien ermöglichen unter solchen Stressbedingungen zu überleben, von großer Bedeutung. Langfristiges Ziel dieser und ähnlicher Arbeiten ist es, Krankheitsfälle durch Infektion mit *L. monocytogenes* zu verhindern bzw. neue Ansätze für Therapien zu entwickeln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

*Listeria monocytogenes* EGD-e, Serotyp 1/2a (Glaser et al., 2001)

*Listeria monocytogenes*-Deletionsmutanten:

**Tab. 2.1 Deletionsmutanten**

Bezeichnung	Genname	Herkunft
$\Delta rli71$	<i>lmo0026</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli77$	<i>lmo0432</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli78$	<i>lmo0470</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli29$	<i>lmo0470</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli31$	<i>lmo0558</i>	Mraheil, 2011
$\Delta rli33-1$	<i>lmo0671</i>	Mraheil, 2011
$\Delta rli33-2$	<i>lmo0671</i>	Mraheil, 2011
$\Delta rli80$	<i>lmo0761</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli53$	<i>lmo0918</i>	Mraheil, 2011
$\Delta rli84$	<i>lmo1066</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli99$	<i>lmo2320</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli100$	<i>lmo2355</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli101$	<i>lmo2376</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli107$	<i>lmo2555</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli50^* = \Delta rli50 \Delta rli112$	<i>lmo2709</i>	Mraheil, 2011
$\Delta rli112 = \Delta rli78 \Delta rli50^*$		Institutsstammsammlung
$\Delta rli111$	<i>lmo2662</i>	Institutsstammsammlung
$\Delta rli47$	<i>lmo2141</i>	Institutsstammsammlung

$\Delta flaA$	<i>lmo0690</i>	Machata, 2009
$\Delta SecA2$	<i>lmo0583</i>	Machata, 2009
$\Delta InlA/B$	<i>lmo0433/lmo0434</i>	Lingnau, 1995
$\Delta CspA(L)$	<i>lmo1364</i>	Busch, 1999

### 2.1.2 Eukaryotische Zelllinie und Materialien der Zellkultur

In dieser Arbeit wurden Zellen der Zelllinie Caco-2 (Katalognummer: DSM ACC 169) verwendet. Es handelt sich dabei um Epithelzellen, die in den 1970er Jahren erstmalig durch den dänischen Arzt Fogh aus einem primären kolorektalen Adenokarzinom eines 72-jährigen Kaukasiers isoliert wurden (Pinto et al., 1983).

MEM	Minimum Essential Medium with Earle's Salts, with L-Glutamine (Gibco BRL)
FKS	100 % fötales Kälberserum (Sigma) bei 56 °C für 30 min inaktiviert
NEA	100 x Non-Essential Aminoacids (Seromed)
L-Glutamine	100 x; 29,3 mg/ml in Normal Saline, 200 mM (PAA Laboratories)
Hanks' Salt Solution	1x; w/o $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , Phenol Red (Seromed)
Trypsin-EDTA	1x; 0,5 g Trypsin (1:20)/L; 0,2 g EDTA/L in 1x PBS (PAA Laboratories)
PBS	Phosphated Buffered Saline (Dulbecco)
Triton X-100	Detergenz (SERVA Electrophoresis GmbH)
Gentamicin	Aminoglykosidantibiotikum
Zellkultur-Schalen	Nunclon™ $\Delta$ (100 x 20 mm, Nunc), Gibson
24-Well Platten	Nunclon™ $\Delta$



### 2.1.3 Medien

BHI-Flüssigmedium	3,7 % [w/v] BHI
BHI-Agarplatten	BHI-Flüssigmedium (3,7 % [w/v] BHI) 1,5 % [w/v] Agar
2x SMM-Medium	1 M Saccharose 20 mM Tris 10 mM MgCl <sub>2</sub> 6xH <sub>2</sub> O 40 mM Maleinsäure H <sub>2</sub> O ad 200 ml pH 6,8
modifiziertes 1x SMMP-Medium	27,5 ml 2x SMM-Medium 20 ml BPB
4x BPB	16 g Nutrient Broth 14 g Bactopepton 12,4 g Hefeextrakt H <sub>2</sub> O ad 1000 ml pH 6,8 bei 121 °C für 15 min autoklaviert

### 2.1.4 Puffer

10x TBE	108 g Tris-HCl 55 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA H <sub>2</sub> O ad 1000 ml pH 8,3
10x PBS	27 mM KCl 1,4 M NaCl 81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4

PBS Dulbecco	w/o $\text{Ca}^{2+}$ , w/o $\text{Mg}^{2+}$ , w/o Phenol red, low endotoxin (Biochrom AG)
Hanks' Salt Solution	w/o $\text{Ca}^{2+}$ , w/o $\text{Mg}^{2+}$ , w/o Phenol red, low endotoxin (Biochrom AG)
10x PCR-Puffer „A“	200 mM Tris-HCl (pH 8,3) 20 mM $\text{MgCl}_2$ 250 mM KCl 0,5 % TWEEN 20 1 mg/ml Gelatine $\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 $\mu\text{l}$
6x Auftragspuffer für Agarose-Gelelektrophorese	400 $\mu\text{l}$ Ficoll 25 % Bromphenolblau $\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 $\mu\text{l}$
5x SDS-Probenpuffer (Laemmli)	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % [w/v] SDS 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol 20 % [v/v] Glycerol 0,125 % [w/v] Bromphenolblau $\text{H}_2\text{O}$ ad 5 ml
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % [w/v] SDS $\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml
SET	50 mM NaCl 5 mM EDTA 30 mM Tris-HCl (pH 7,0)

## 2.1.5 Lösungen

Coomassie-Färbelösung	4 Tabletten Coomassieblue 10 % [v/v] Eisessig (96 % [v/v] Essigsäure) 50 % [v/v] Ethanol H <sub>2</sub> O ad 250 ml
Blitzentfärber	10 % [v/v] Eisessig (96 % [v/v] Essigsäure) 40 % [v/v] Ethanol H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
Polyacrylamid-Trenngel (12,5 %)	1,67 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 2,8 ml Polyacrylamid 66,65 µl 10 % [w/v] SDS 2,09 ml H <sub>2</sub> O 3,34 µl TEMED 50 µl 10 % [w/v] APS
Sammelgel (7,5 %)	835 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 635 µl Polyacrylamid 33,35 µl 10 % [w/v] SDS 1,8 ml H <sub>2</sub> O 1,15 µl TEMED 33,35 µl 10 % [w/v] APS

## 2.1.6 Größenstandards

### DNA-Größenstandard

1 Kb Plus DNA Ladder™

(Fa. Gibco™ Invitrogen Cooperation)

Größe der Banden [bp]:

100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650,  
2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000,  
10000, 11000, 12000

### DNA-Größenstandard für kleine PCR-Produkte

O'GeneRuler™ DNA Ladder, Low Range

(Fermentas)

Größe der Banden [bp]:

25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700

### Protein-Größenstandard

PageRuler™ Unstained Protein Ladder

(Fermentas)

Größe der Banden [kDA]:

10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120,  
150, 200

### 2.1.7 Oligonukleotide

Tab. 2.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' – 3'
16S-f	TTAGCTAGTTGGTAGGGT
16S-r	AATCCGGACAACGCTTGC
FMN-f-KS	TTGAGGGAGAGTTTGTGCAT
FMN-r-KS	GTTGACTCTGGTGTAATTCC
<i>rli44</i> -f-KS	TGGAAAGGATAACCCATGACCG
<i>rli44</i> -r-KS	AGCCCATTTAAGATGGCAGC
<i>rli47</i> -f-KS	CAAACCTGGTGTACAAGCTG
<i>rli47</i> -r-KS	GGCCATGAATGATACGATAC
<i>rli78</i> -f-KS	CATGAAAAGAGAGCCATGCG
<i>rli78</i> -r-KS	CCATCTAATCCACTTTAGTG
<i>rnpB</i> -f	AATAGGCATTCAACCAGGTC
<i>rnpB</i> -r	ACGAGCGAGAACTCAAAC
<i>ssrA</i> -f	TGACTCCATCGTTTAGCACC
<i>ssrA</i> -r	ATTCGACAGGGATAGTTCG
<i>ssrS</i> -f	CCAATCGTACCGTTTAGGAT
<i>ssrS</i> -r	TTCACACGAGGAAGTGCAAA

### 2.1.8 Kits

cDNA-Aufreinigung	QIAquick® PCR-Purification Kit, Qiagen
cDNA-Synthese	SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen
PCR	Taq-DNA-Polymerase, Invitrogen
RNA-Isolierung	miRneasy Mini Kit, Qiagen Rnase free Dnase Set, Qiagen
RT-PCR	OneStep RT-PCR Kit, Qiagen

## 2.1.9 Geräte

Tab. 2.3 Geräte

Gerätebezeichnung	Firma
Autoklav	Getinge
Brutschrank	Heraeus
CO <sub>2</sub> -Brutschrank ThermoForma Steri-Cycle CO <sub>2</sub> -Inkubator	ThermoScientific
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Water-Jacketed Incubator 3250	ThermoScientific
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Eigenbau Institutswerkstatt
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Biometra
Geldokumentationssystem Molecular Imager Gel Doc XR System	BioRad
Inkubationsschrank für <i>Galleria</i>	Thermo Fisher Scientific
Inkubationsschüttler Ecotron	Infors HAT
Mikroapplikator für <i>Galleria</i> -Versuche	World Precisions Instruments
Mikroskop ID03 Standard 25	Zeiss
Mikroskop WILL Wilovert S	hund
Mikrozentrifuge Perfect Spin 24	Peqlab Biotechnologie GmbH
Nanodrop 2000 Micro-Volume UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific
PCR-Maschine ThermalCycler	Applied Biosystems
pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH&Co KG
Photometer Ultrospec® 3000 UV/Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech
Pipetten	Biohit, Gilson
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Thermo ScientificPeqlab Biotechnologie GmbH

StepOnePlus™ System	Applied Biosystems®, Life Technologies GmbH
Sterilbank Class II	NUARE Biological Safety Cabinets ThermoScientific
Sterilbank Clean Air Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific
Taumler	IKA
Thermoblock	Eigenbau Institutswerkstatt
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortexer Vibrofix VF1 Electronic	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA®-Labortechnik
Vortexer Vortex Genie® 2	Scientific Industries Inc.
Waage	Kern EG
Waage Feinwaage H54	Mettler
Wasserbad Grant	SUB
Wasserbad HAT	Infors AG
Wasserbad Type 1083 GFL®	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Zählkammer Neubauer (0,100 mm, 0,0025 mm²)	Labor Optik
Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf AG
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus

### 2.1.10 Software

SeqBuilder, Lasergene (DNASTAR®)

CLC Sequence Viewer

MS Office Word, MS Office Excel

Citavi

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterienkulturen

#### 2.2.1.1 Kultivierung der Bakterienstämme

Die Anzucht von *L. monocytogenes* erfolgte in BHI-Flüssigmedium. Es wurde eine Kolonie in 10 ml Medium in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur für die weitere Verarbeitung 1:50 in frischem Medium verdünnt und bis zur gewünschten optischen Dichte unter gleichen Bedingungen wie die Übernachtskultur herangezogen. Für die Proteinisolierung wurden größere Volumina an Bakterienkulturen benötigt, so dass die Kultivierung hier mit 100 ml Medium in 300 ml-Erlenmeyerkolben durchgeführt wurde.

#### 2.2.1.2 Messung des Bakterienwachstums

Die Messung des Bakterienwachstums erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Spektralphotometer. Hierzu wurde 1 ml der Bakterienkultur aus dem Anzuchtkolben entnommen und die OD in Einmal-Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Referenz diente das Anzuchtmedium BHI. Ab einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 wurde die Probe für die Messung 1:2 mit dem Anzuchtmedium verdünnt. Für weitere Berechnungen bei Infektionsversuchen wurde zu Grunde gelegt, dass bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0  $1,5 \times 10^9$  Bakterien/ml vorhanden sind.

#### 2.2.1.3 Kolonie-bildende Einheiten und Verdünnungsreihen

Um die genaue Bakterienzahl zu ermitteln, wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Proben hergestellt, ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro ml bestimmt. Die Verdünnung erfolgte in 10er-Schritten in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen mit 1x PBS (pH 7,4) oder 0,9 % NaCl. Von der letzten Verdünnungsstufe wurden 100 µl auf BHI-Agarplatten ausplattiert und für 12-24 h bei 37 °C inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 1 mm erreicht hatten. Die KBE auf der Platte wurden ausgezählt und die KBE/ml bestimmt. Für jede Probe wurden in der Regel Duplikate oder Triplikate ausplattiert. Die Verdünnungsstufe wurde so gewählt, dass möglichst zwischen 30 und 300 KBE auf einer Platte zu zählen waren.



#### 2.2.1.4 Kälteschockversuch

In dieser Arbeit sollten die Eigenschaften verschiedener Stämme von *L. monocytogenes* nach dem Einfluss von Kälteschock untersucht werden. Hierzu wurden der Wildtyp EGD-e und die zu testenden sRNA-Mutanten wie oben beschrieben angezüchtet und verdünnt. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von ca. 0,6 wurden die Kolben für 15 s in Eiswasser geschwenkt und so von 37 auf 15 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden sie je nach Fragestellung für 1 h, 2 h oder 24 h bei 15 °C und 180 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut die OD<sub>600nm</sub> gemessen. Bei der Vorbereitung der Proben für die RNA-Isolierung wurde von diesem Protokoll insofern abgewichen, dass die Kolben statt 15 s 5 min in Eiswasser geschwenkt wurden, da dies der Durchführung in früheren Versuchen entsprach (Kuchmina, 2007).

#### 2.2.1.5 Schwärmverhalten auf Weichagar (Motility Assay)

Es wurde jeweils eine Kolonie der jeweiligen sRNA-Mutante mit einem sterilen Zahnstocher von der BHI-Agarplatte gepickt und in eine Platte mit BHI-Weichagar mit 0,3 % Agar gestochen. Jede Platte wurde in vier Quadranten unterteilt, so dass jeweils der Wildtyp EGD-e als Positivkontrolle, die *ΔflaA*-Mutante als Negativkontrolle und zwei sRNA-Mutanten auf eine Platte gestochen wurden. Die Platten wurden mit Parafilm zugeklebt und bei 37 °C für 2 Tage, bei 15 °C für 5 Tage und bei 4 °C für 30 Tage inkubiert. Am Tag 2 bzw. Tag 5 bzw. Tag 30 wurde der Durchmesser der geschwärmten Bakterien gemessen und in Relation zum Wildtyp gesetzt. Der Versuch wurde für jede Mutante mindestens dreimal wiederholt.

### 2.2.2 RNA-Analyse

#### 2.2.2.1 RNA-Isolierung

Für die nachfolgende RT- und qRT-PCR wurde die RNA aus *L. monocytogenes* EGD-e nach Wachstum bei 37 °C und 1 h, 2 h und 24 h nach Kälteschock isoliert. Die Proben wurden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von ca. 0,6 inkubiert. Für die „Kälteschockproben“ wurde der Kälteschock wie oben beschrieben durchgeführt. Das weitere Vorgehen nach der Inkubation bei 15 °C war identisch mit dem der „37 °C-Proben“. Es wurden 500 µl Kultur entnommen und zu 1 ml RNA-Protect (QIAGEN) gegeben, 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, 10 min mit 8000 g abzentrifugiert,

der Überstand verworfen und die Bakterienpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur Isolierung bei -80 °C aufbewahrt.

Für die RNA-Isolierung wurden die Pellets aufgetaut und mit 200 µl SET mit 10 % SDS gewaschen (Zentrifugation für 3 min bei RT mit 13200 rpm, Überstand verworfen), dabei wurden 3 Pellets einer Probe zu einem zusammengeführt. Zum Pellet wurden 83 µl 50 mM Tris (pH 6,5) mit 50 mg/ml Lysozym gegeben, gemischt, anschließend 2 µl SUPERase, 5 µl Mutanolysin (5 U/µl) und 10 µl Proteinase K hinzugefügt und das Pellet resuspendiert. Die Probe wurde im Thermomixer für 45 min bei 37 °C und 350 rpm inkubiert, wobei die Bakterienwand durch das Enzymgemisch aufgeschlossen wurde.

Die weiteren Arbeitsschritte folgten im Wesentlichen dem Protokoll des miRNeasy Kit (Qiagen). Es wurden 600 µl Qiazol Lyse Reagenz hinzugefügt, gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 140 µl Chloroform hinzugefügt und bei RT für weitere 3 min inkubiert. Die Probe wurde bei 4 °C für 15 min mit 13200 rpm abzentrifugiert, wobei sich die Phasen voneinander trennten. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde abpipettiert und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Es wurde das 1,5-fache Volumen 100 % Ethanol hinzugefügt und durch Pipettieren gut vermischt. Die Probe wurde auf eine Rneasy Mini spin column in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, für 15 s bei 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen wurden 350 µl RWT Puffer auf die Säule gegeben, 15 s mit 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Darauf folgten 45 min Inkubation bei RT mit einem Inkubationsmix, bestehend aus 105 µl RDD Puffer und 10 µl Dnase Stocklösung. Es folgten weitere Waschschrte. Zunächst wurden 350 µl RWT Puffer auf die Säule gegeben, 15 s mit 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen, anschließend wurde dieser Schritt mit 500 µl RPE Puffer wiederholt. Zuletzt wurden erneut 500 µl RPE Puffer hinzugegeben und der Durchfluss nach Zentrifugation für 2 min mit 8000 g verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde 1 min mit höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Rneasy Mini spin column wurde nun auf ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gesetzt und die RNA eluiert, indem 40 µl Rnase-freies Wasser auf die Säule pipettiert wurden und die Probe 1 min mit 8000 g zentrifugiert wurde. Die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.2.2.2 cDNA-Synthese und Aufreinigung

Die isolierte RNA muss mittels Reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, um als Template in der qRT-PCR eingesetzt werden zu können. Dazu wurden 3 µg RNA mit jeweils 1 µl Hexa und Nona Primer (10 pmol/µl) gemischt und mit Rnase-freiem H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min ohne Schütteln bei 70 °C und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Es wurden 2 µl DTT, 1 µl dNTP, 1 µl RT-Enzyme (Sup. II Invitrogen) (RNA-abhängige DNA-Polymerase) und 4 µl 5x Puffer hinzugefügt, so dass man ein Gesamtvolumen von 20 µl erhielt. Der Ansatz wurde im Thermocycler für 1,5 h bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die cDNA mit dem QIAquick® PCR-Purification Kit aufgereinigt.

#### 2.2.2.3 Bestimmung der cDNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration von RNA nach der Isolierung und von cDNA nach der reversen Transkription wurde mit dem Spektrophotometer Nanodrop bestimmt. Die Absorption der aufgereinigten Proben wurde bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Der Absorptionsquotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  gibt den Reinheitsgrad der cDNA bzw. der RNA an. Der Wert sollte bei reinen Proben für DNA zwischen 1,8-2,0 und für RNA bei 2,0 liegen. Abweichungen weisen auf eine Kontamination durch Proteine hin.

#### 2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können die zuvor mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wird ein Agarosegel hergestellt und die PCR-Produkte aufgetragen. Es wird Spannung angelegt und die PCR-Produkte wandern auf Grund ihrer globalen negativen Ladung vom Minus- zum Pluspol. Kleine Fragmente können schneller, große Fragmente langsamer durch die Poren des Agarosegels wandern. Je nach Größe der Produkte wird ein 1 oder 2 %iges Gel gewählt. Für kleinere Fragmente ist ein höherprozentiges Gel geeigneter, da die Poren kleiner sind und die Fragmente so langsamer wandern und sich besser auftrennen.

Zu Herstellung eines Agarosegels wurden 1 bzw. 2 % Agarose in 1x TBE-Puffer in einem Kolben in der Mikrowelle aufgeköcht und dabei zwischendurch geschwenkt, um einen Siedeverzug zu vermeiden. Die Lösung wurde kurz unter kaltem Wasser abgekühlt und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Das Gel wurde in einen Gelrahmen gegossen. Durch eingesetzte Kämme wurden Taschen zum Auftragen der Proben

geformt. Das abgekühlte Gel wurde in Gelkammern mit 1x TBE gelagert. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V und 200 mA für ca. 45-60 min. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid konnten die Banden unter UV-Licht dargestellt und mit einem Geldokumentationssystem protokolliert werden.

#### 2.2.2.5 RT-PCR (One Step)

Das Qiagen OneStep RT-PCR Kit ermöglicht die Reverse Transkription und die PCR in einem Schritt. Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

**Tab. 2.4 Pipettierschema für OneStep RT-PCR**

RNA (100 bzw. 300 ng/μl)	1 μl
5x Puffer	1 μl
dNTPs (10 mM)	0,2 μl
Primer A forward (10 pMol/μl)	0,9 μl
Primer B reverse (10 pMol/μl)	0,9 μl
RT-Enzym	0,2 μl
RNAout Invitrogen (40 U/μl)	0,1 μl
H <sub>2</sub> O	15,7 μl
Gesamtvolumen	20 μl

Im Programmablauf gibt es im Unterschied zur herkömmlichen PCR einen zusätzlichen Schritt (30 min bei 50 °C), während dem die Reverse Transkription stattfindet:

**Tab. 2.5 Programm der OneStep RT-PCR**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Reverse Transcription	50 °C	30 min	
2. Activation of Taq Polymerase	95 °C	15 min	
3. Melting	94 °C	30 s	30 x
4. Annealing	±50 °C *	30 s	
5. Extension	72 °C	60 s	
6. Additional Annealing	72 °C	10 min	
7. Storage	4 °C	∞	

\*Die Annealing Temperatur wurde je nach Schmelztemperatur der Primer individuell gewählt.

#### 2.2.2.6 qRT-PCR

Die quantitative RealTime-PCR wurde mit dem StepOne Plus der Firma Life Technologies durchgeführt. Es wurde der Quantity-SYBERGreen PCR-reaction Mix von Qiagen verwendet. Wie die herkömmliche PCR dient die qRT-PCR der Amplifikation von Nukleinsäure-Sequenzen. Zusätzlich ist durch einen fluoreszierenden Farbstoff eine quantitative Messung der entstandenen DNA möglich. Diese erfolgt, wie der Name RealTime-PCR beschreibt, in Echtzeit während der exponentiellen Phase der PCR. Die Fluoreszenz nimmt proportional zu den PCR-Produkten zu.

**Tab. 2.6 Pipettierschema für qRT-PCR**

Master Mix (Syber Green)	12,5 µl
Primer A+B (forward und reverse) 10 pmol	2 µl
cDNA	50 ng
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl
Gesamtvolumen	25 µl

**Tab. 2.7 Programm der qRT-PCR**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Activation of Taq Polymerase	95 °C	15 min	
2. Melting	94 °C	30 s	40 x
3. Annealing	47 °C	30 s	
4. Extension	72 °C	1 min	
5. Storage	20 °C	2 min	

Pro Probe wurden drei Wells auf einer 96-Well-Platte pipettiert. Vor der eigentlichen qRT-PCR wurde die Effizienz der eingesetzten Primer getestet, indem eine Standardkurve mit unterschiedlichen Konzentrationen cDNA erstellt wurde (0,002 ng – 200 ng in 10er Potenzen). Der Korrelationskoeffizient sollte idealerweise 1 betragen. Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O statt cDNA eingesetzt. Eine DNA-Kontamination der Proben wurde ausgeschlossen, indem die RNA selbst an Stelle des Template eingesetzt wurde. War die Probe nicht kontaminiert, gab es auf Grund des fehlenden Templates keine Amplifikationskurve.

#### 2.2.2.7 RNA-Sequenzierung

Die cDNA-Bibliotheken wurden von Vertis Biotechnologie AG (Freising-Weihenstephan) hergestellt. Die Sequenzierung der Bibliotheken wurde von Eurofins Genomics (Ebersberg) mit der Illumina Hi-Seq Plattform bereitgestellt. Bioinformatisch analysiert wurden die Daten mit CLCBio Genomic WorkBench von Dr. A. Billion (zu dem Zeitpunkt Institut für Medizinische Mikrobiologie).

### 2.2.3 Proteinanalytik

#### 2.2.3.1 Proteinisolierung aus *L. monocytogenes* und Deletionsmutanten

Es wurden Proteine aus dem Überstand (sezernierte Proteine), Zellwandproteine und zytoplasmatische Proteine isoliert. Diese drei Fraktionen wurden zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten aus den Bakterienkulturen isoliert: zum einen nach Wachstum bei 37 °C zum Zeitpunkt, an dem das Bakterienwachstum eine OD<sub>600nm</sub> von 1,0 erreicht hatte; zum anderen aus Bakterienkulturen, auf die zunächst ein Kälteschock

angewendet wurde (s.o.) und die anschließend bei 15 °C und 180 rpm für 1 h, 2 h bzw. 24 h inkubiert worden waren.

Für den Versuch wurden für den Wildtyp *L. monocytogenes* EGD-e und die sRNA-Mutanten Übernachtskulturen angesetzt. Am folgenden Tag wurden die Kulturen 1:50 in einem Gesamtvolumen von 100 ml in 300 ml-Erlenmeyerkolben verdünnt. Pro Stamm wurden 4 Kolben angesetzt (jeweils einer für das Wachstum bei 37 °C und drei für den Kälteschockversuch und anschließendes Wachstum für 1 h, 2 h oder 24 h bei 15 °C). Die verdünnten Kulturen wurden im 37 °C-Inkubationsraum auf einem Schüttler bei 180 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 (für den 37 °C-Versuch) bzw. OD<sub>600nm</sub> von 0,6 für den Kälteschockversuch herangezogen. War die gewünschte OD<sub>600nm</sub> erreicht bzw. wurde der Kälteschockversuch inklusive weiterer Inkubationszeit bei 15 °C durchgeführt, wurden die Kulturen wie folgt weiterbehandelt:

Die Kulturen wurden aus den Kolben in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen umgefüllt und anschließend in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4 °C und 6000 rpm 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Greiner-Röhrchen überführt, hieraus wurden die Überstandsproteine isoliert. Aus den beiden Pellets, die möglichst frei von Überstand sein sollten, wurden die zytoplasmatischen Proteine und die Zellwandproteine isoliert.

### **Überstandsproteine**

Für die Isolierung der Überstandsproteine wurde zum Überstand von 50 ml Bakterienkultur 0,1 Volumenteil Trichloressigsäure (500 g kristallines TCA mit 200 ml Seral-H<sub>2</sub>O aufgelöst) hinzugefügt und die Proteine über Nacht auf Eis im Kühlraum gefällt. Am nächsten Morgen wurden die Proteine bei 4 °C und 6000 rpm 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl 1 M Tris-HCl pH 8,8 resuspendiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

### **Zellwandassoziierte Proteine**

Zur Isolierung der zellwandassoziierten Proteine wurde ein Pellet von 50 ml Bakterienkultur in 1,6 ml 1x PBS pH 7,4 resuspendiert, in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 0,1 Volumenteil 10 % SDS versetzt (Endkonzentration 1 %). Die Suspension wurde 45 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert und anschließend für 20 min bei RT und 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein

neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden mit 0,1 Volumenteil TCA über Nacht auf Eis im Kühlraum gefällt. Am nächsten Morgen wurden die Proben auf RT gebracht und 20 min bei RT und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gefäße auf Zellstoff abgetupft, um das Pellet zu trocknen. Das Pellet wurde in 200 µl 1 M Tris-HCl pH 8,8 auf Eis resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### **Zytoplasmatische Proteine**

Das Pellet aus 50 ml Kultur wurde in 10 ml sterilem Milli-Q H<sub>2</sub>O gewaschen, indem es resuspendiert, bei 6000 rpm und 4 °C 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurde das Pellet in 2,5 ml modifiziertem 1x SMMP resuspendiert und am Abend mit 250 µl Lysozym (100 mg/ml in 2x SMM, sterilfiltriert) versetzt. Die Suspension wurde über Nacht (ca. 12-16 h) ohne Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde anhand des mikroskopischen Bildes eine Kontrolle durchgeführt. Hierzu wurden 3 µl 1x PBS und 3 µl der Kultur auf einem Objektträger vermischt, mit einem Deckgläschen bedeckt und mikroskopiert. Die Zellen sollten nun rundlich und nicht mehr länglich aussehen. Anschließend wurden die Proben bei 6000 rpm und 4 °C 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 5 ml modifiziertem 1x SMMP vorsichtig gewaschen und bei 6000 rpm und 4 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Probe ein weiteres Mal bei 6000 rpm 20 min zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 200 µl sterilem Milli-Q H<sub>2</sub>O (4 °C kalt) lysiert, indem mit einer Pipettenspitze gerührt wurde, bis keine Klümpchen mehr vorhanden waren und die Probe eine schleimige Konsistenz hatte. Die Probe wurde in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 13000 rpm zwei- bis dreimal je 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils vorsichtig abpipettiert, ohne dass das schleimige Pellet berührt wurde, bis kein Überstand mehr entstand. Der Überstand wurde in ein frisches Mikroreaktionsgefäß pipettiert und bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.3.2 Proteinbestimmung mittels Bradford im 96-Well-Format**

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford im 96-Well-Format bestimmt. Als Standardreihe dienten die folgenden Verdünnungsstufen von BSA:



**Tab. 2.8 BSA-Standardreihe für 24 µl Endvolumen**

Konzentration	Puffer	BSA
0 ng/ml	24 µl	0 µl
0,05 ng/ml	22,8 µl	1,2 µl
0,1 ng/ml	21,6 µl	2,4 µl
0,2 ng/ml	19,2 µl	4,8 µl
0,3 ng/ml	16,8 µl	7,2 µl
0,4 ng/ml	14,4 µl	9,6 µl
0,5 ng/ml	12,0 µl	12,0 µl
0,6 ng/ml	9,6 µl	14,4 µl

Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Puffer wurde 1 M Tris-HCl pH 8,8 (der gleiche Puffer, in dem zuvor auch die Pellets gelöst worden waren) verwendet. Die Proben wurden auf eine 96-Well Platte mit flachem Boden pipettiert. Die Bradford-Ausgangslösung wurde 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Pro Well wurden 10 µl der jeweiligen Probe und 200 µl der verdünnten Bradford-Lösung pipettiert. Die beladene und mit Klebefolie abgedeckte Platte wurde auf dem Schüttler bei ca. 600 rpm gemischt und anschließend mindestens 5 min bei RT stehen gelassen. Nach der Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm in einem Plattenphotometer gemessen.

Vor dem Beladen der Platte musste ermittelt werden, ob die Proteinproben unverdünnt oder in einer bestimmten Verdünnung aufgetragen werden müssen, um im Konzentrationsbereich der Standardkurve zu liegen. Dazu wurden zu Beginn verschiedene Ansätze der Proben mit Puffer verdünnt (1:50 / 1:20 / 1:10 / 1:5) und optisch mit der Standardkurve verglichen.

### 2.2.3.3 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE

Mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden die Proteine elektrophoretisch nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt und können anschließend durch Färbung sichtbar gemacht werden.

Die Proteine wurden zunächst im Thermoblock bei 99 °C für 5 min mit 5x SDS-Probenpuffer inkubiert. Das im Probenpuffer enthaltene SDS ist ein anionisches Detergenz, das den Proteinen eine negative Ladung verleiht. Durch die Denaturierung und die Abstoßung der negativen Moleküle untereinander werden die Proteine linearisiert und können im Gel der Größe nach aufgetrennt werden. Es wurde immer die gleiche Proteinkonzentration aufgetragen. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten, die mit Klemmen zusammengehalten wurden, in einen durch Spacer gebildeten Zwischenraum gegossen. Als erstes wurde das Trenngel gegossen. Sobald dieses erhärtet war, wurde das Sammelgel darauf pipettiert. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, durch dessen Zinken nach dem Erhärten Taschen entstanden. In diese wurden die Proben aufgetragen. Das fertig gegossene Gel wurde mit den Glasplatten in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt, so dass das Gel vollständig bedeckt war. In die erste Tasche wurden 10 µl Marker aufgetragen, dann folgten die Proben. Nicht benötigte Taschen wurden mit Auftragspuffer aufgefüllt. Im pH-neutralen Sammelgel werden die Proteine zunächst aufkonzentriert und sammeln sich auf Grund des pH-Gradienten an der Grenze zum basischen Trenngel. So treten alle Proteine zum gleichen Zeitpunkt in das Trenngel über, wo sie nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden (kleine Moleküle wandern schneller durch die Poren als große). Die Elektrophorese wurde bei 125 V und 220 mA für ca. 1,5 h durchgeführt.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Das Gel wurde für mehrere Stunden in eine Dose mit Coomassie-Lösung gelegt und auf dem Taumler geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte mit Blitzentfärber ebenfalls auf dem Taumler so lange, bis der Gelhintergrund klar war. Zur Dokumentation wurde das Gel eingescannt.

### 2.2.4 Zellkultur

#### 2.2.4.1 Kultivierung von Caco-2-Zellen

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank und mit sterilen Materialien, Lösungen und Puffern durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Zellkultur-Petrischalen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Als Nährmedium für Caco-2-Zellen wurde MEM verwendet, dem 10 % FKS und 1 % NEA hinzugefügt wurden. Pro Petrischale wurden 10 ml Medium benutzt. Sobald die

Petrischalen konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das alte Medium abpipettiert und die Zellen mit 1x Hanks' Salt Solution gewaschen. Es wurde 1 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Platte im Brutschrank für 5 min inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden gelöst hatten. Zur Neutralisation des Trypsins wurde 1 ml Medium hinzugefügt, die Zellen auf zwei neue Petrischalen verteilt und frisches Medium hinzugegeben.

### 2.2.4.2 Infektion von Caco-2-Zellen

Die Caco-2-Zellen wurden für den Infektionsversuch verwendet, sobald die Platte konfluent bewachsen war. Für die Infektion wurden Übernachtskulturen von den Bakterien hergestellt, am nächsten Morgen 1:50 mit BHI verdünnt und bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 wachsen gelassen. Bei einer  $OD_{600nm}$  von exakt 1,0 wurde mit 1 ml, ansonsten mit einem angepassten Volumen weitergearbeitet. Die Bakterien wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und in MEM resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer MOI 10 (Multiplicity of Infection) infiziert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen und es wurde 1 ml Gentamicin 20 ng/ml in MEM pro Well hinzugegeben. Es folgte erneut eine Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und 1 ml 0,2 %iges Triton X-100 pro Well gekühlt (direkt aus dem Kühlschrank) hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt und ausplattiert. Für den Kälteschockversuch wurden aus der gleichen Übernachtskultur 1:50 verdünnte Kulturen bis zu einer  $OD_{600nm}$  von ca. 0,6 bei 37 °C inkubiert und der Kälteschock wie oben beschrieben durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 15 °C wurde mit 1 ml der Bakterienkultur wie mit der bei 37 °C inkubierten Kultur weitergearbeitet.

### 2.2.5 Infektion von *Galleria mellonella*

Es wurden Larven der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* infiziert, die über die Firma fauna topics GmbH bezogen wurden.

Bis zur Infektion wurden die Larven bei 30 °C im Dunkeln in Petrischalen mit Futter aufgezogen. Das Futter setzt sich aus 22 % Maismehl, 22 % Weizenkeimen, 11 % Trockenhefe, 17,5 % Bienenwachs, 11 % Honig und 11 % Glycerin zusammen.

Für die Infektion wurden Larven im letzten Larvenstadium verwendet, die von Farbe und Größe her möglichst einheitlich sein sollten. Die Injektion erfolgte mit Hilfe eines Mikroapplikators mit 1 ml Einmalspritzen von dorsolateral in das Hämözöl. Nach der Injektion wurden jeweils 10 Larven mit Futter in einer Petrischale bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Die Überlebenskurve wurde über 7 Tage aufgenommen. Eine Larve wurde als tot betrachtet, wenn sie sich nicht mehr bewegte und auch auf Berührung, z. B. mit einer Pinzette, keine Zuckungen mehr zeigte.

Für die Infektionsversuche wurden Übernachtkulturen von *L. monocytogenes* EGD-e und der sRNA-Mutante in 10 ml BHI angesetzt und bei 37 °C mit 180 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden 1:50 verdünnt und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von ca. 1,0 wachsen gelassen. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von exakt 1,0 wurde mit 1 ml Bakterienkultur weitergearbeitet, ansonsten wurde das Volumen an die jeweilige OD<sub>600nm</sub> angepasst. Das entsprechende Volumen der jeweiligen Kultur wurde 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend zweimal mit jeweils 1 ml 0,9 % NaCl gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml 0,9 % NaCl resuspendiert und 1:10 in 0,9 % NaCl verdünnt. Von dieser Verdünnungsstufe wurden jeweils 10 µl pro Larve injiziert. Pro Stamm und Experiment wurden 20 Larven infiziert. Als Kontrolle wurde 10 Larven jeweils 10 µl 0,9 % NaCl injiziert. Ausgehend von der Annahme, dass bei einer OD<sub>600nm</sub>=1,0 etwa  $1 \times 10^9$  KBE/ml vorhanden sind, betrug das Inokulum ungefähr  $10^6$  KBE/Larve. Um das genaue Inokulum zu ermitteln, wurde für jeden Stamm eine Verdünnungsreihe des Inokulums in PBS oder NaCl 0,9 % bis  $10^{-5}$  angefertigt und jeweils dreimal 100 µl ausplattiert. Für den Kälteschockversuch wurden aus der gleichen Übernachtkultur 1:50 verdünnte Kulturen bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von ca. 0,6 bei 37 °C inkubiert und der Kälteschock wie oben beschrieben durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 15 °C wurde mit 1 ml der Bakterienkultur wie mit der bei 37 °C inkubierten Kultur weitergearbeitet.

## 2.3 Statistische Analyse

Sofern nicht explizit anders erwähnt, wurden von allen Versuchen mindestens drei biologische Versuche durchgeführt und Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung von zwei Ergebnissen erfolgte mit dem Student's T-Test. Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn der P-Wert <0,05 war.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Wachstum

Wachstumsversuche mit dem Wildtyp EGD-e als Referenz und sRNA-Deletionsmutanten können Aufschluss darüber geben, ob sRNAs in *L. monocytogenes* unter bestimmten Bedingungen zum Wachstum und Überleben benötigt und daher stärker exprimiert werden. Zeigen sich Unterschiede im Vergleich von Wildtyp und einer Deletionsmutante, können Rückschlüsse auf die Bedeutung und mögliche Funktion der deletierten sRNA gezogen werden.

In dieser Arbeit wurden Wachstumsversuche mit allen sRNA-Mutanten, die bereits im Institut hergestellt wurden (s. Tab. 2.1), und dem Wildtyp EGD-e als Referenz durchgeführt. Untersucht wurde das Wachstum in flüssigem BHI-Medium und auf festen Agarplatten, sowie das Schwärmverhalten auf Weichagar. Es wurden verschiedene Temperatur- und Stressbedingungen getestet.

#### 3.1.1 Wachstumskurven

Wachstumskurven bei der für *L. monocytogenes* optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C lagen bereits vor Beginn dieser Arbeit im Institut vor. Sie zeigten keine Unterschiede im Wachstumsverhalten von Wildtyp EGD-e und Deletionsmutanten (Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wurden Wachstumskurven unter Kältebedingungen bei zwei verschiedenen Temperaturen, 4 und 15 °C, in BHI-Medium durchgeführt. Weitere Versuche wurden bei denselben Temperaturen mit Zusatz von Ethanol und Wasserstoffperoxid durchgeführt. Außerdem wurden Wachstumskurven unmittelbar nach dem Kälteschock von 37 auf 15 °C sowie nach 24-stündigem Wachstum bei 15 °C nach dem Kälteschock aufgenommen.

Alle Wachstumskurven waren als Screening gedacht und sollten dazu dienen, Deletionsmutanten herauszufiltern, die sich im Wachstum vom Wildtyp unterscheiden und sich deshalb für weitergehende Analysen anbieten. Aus diesem Grund wurden die folgenden Versuche nur einmal durchgeführt, dafür wurde aber eine jeweils möglichst große Zahl an Deletionsmutanten untersucht.

### 3.1.1.1 Wachstum bei 4 °C

Das Wachstum von Bakterienkulturen lässt sich in drei Phasen unterteilen: die Anlaufphase (lag-Phase), die exponentielle Phase (log-Phase) und die stationäre Phase. Eventuell kann die Absterbephase noch separat als vierte Phase abgegrenzt werden. Abhängig von der Wachstumstemperatur unterscheidet sich der Kurvenverlauf: im Vergleich zur für *L. monocytogenes* optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C ist die Kurve bei 4 °C deutlich flacher, das heißt die einzelnen Phasen werden erst nach längerer Zeit erreicht. Die drei Phasen sind in Abb. 3.1 beispielhaft gut zu erkennen. In der Anlaufphase wachsen die Bakterien langsam an, das Medium ist noch frisch und die Nährstoffe unverbraucht. Diese Phase dauert ungefähr bis Tag 3. Von Tag 3 bis Tag 6 steigt die Bakterienzahl exponentiell an, die Bakterien haben ihren Stoffwechsel an die Wachstumsbedingungen angepasst und befinden sich in einer optimalen Wachstumsphase. In der stationären Phase sind die Nährstoffe verbraucht und der Raum ist durch die Bakterienzahl begrenzt. Es entsteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen absterbenden und sich teilenden Zellen. Schließlich kommt es zum Übergang in die Absterbephase.

Die Wachstumskurven bei 4 °C wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt war in BHI-Medium ohne Zusätze die stationäre Phase/Absterbephase erreicht und keine entscheidende Veränderung mehr zu erwarten.

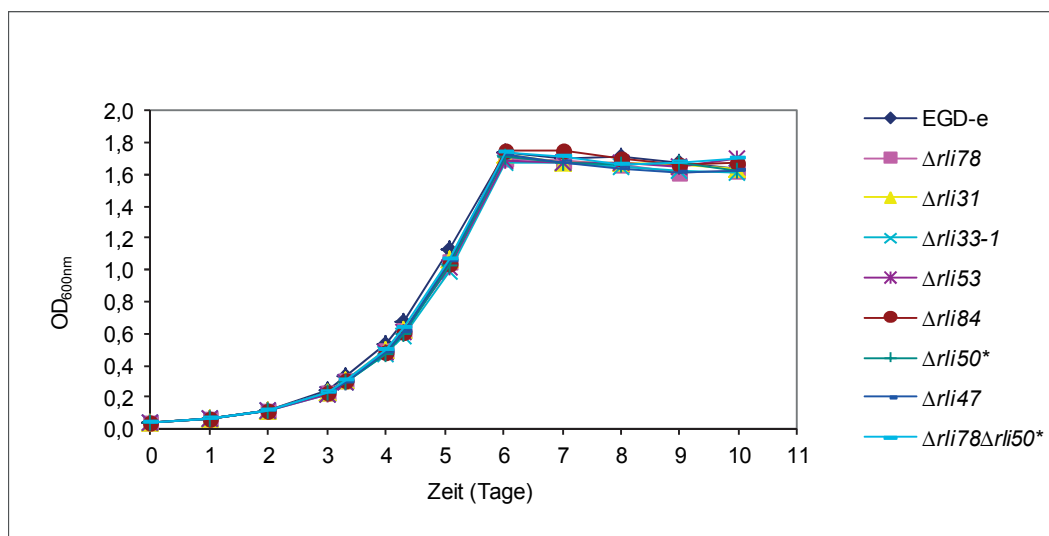
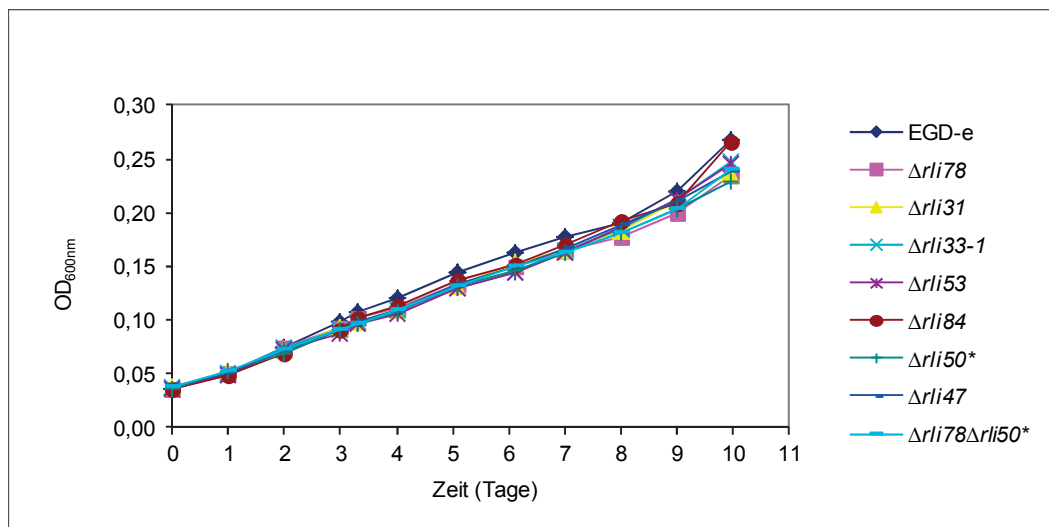


Abb. 3.1 Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium bei 4 °C und 180 rpm.

In reinem BHI-Medium (Abb. 3.1) zeigen die acht untersuchten sRNA-Deletionsmutanten kein abgeschwächtes Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp. In allen Wachstumsphasen ist der Kurvenlauf nahezu identisch.

Die beiden folgenden Wachstumskurven wurden mit dem Zusatz von Ethanol und Wasserstoffperoxid zum BHI-Medium aufgenommen. Diese beiden Stoffe wirken als Stressfaktoren auf das Bakterienwachstum und führen zu einer Verlangsamung vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase. Es soll untersucht werden, ob durch den zusätzlichen Stress Unterschiede sichtbar gemacht werden können, die in reinem BHI-Medium nicht auftreten.

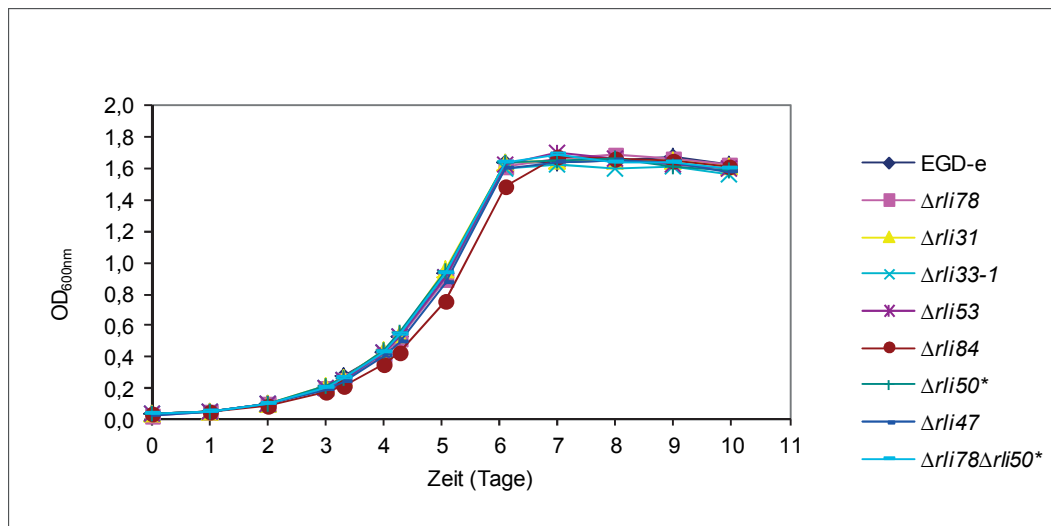
Für Ethanol wurde eine Konzentration von 5 % gewählt. Diese hatte sich in vorangehenden Versuchen als optimal herausgestellt, um Effekte im Wachstum deutlich zu machen, ohne dieses zu stark zu hemmen (Krawitz, 2011). Da Wasserstoffperoxid einen deutlich stärker hemmenden Einfluss auf das Bakterienwachstum hat als Ethanol, wurde hier eine weitaus geringere Konzentration von 0,045 % verwendet.



**Abb. 3.2** Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium mit Zusatz von 5 % Ethanol bei 4 °C und 180 rpm.

Auch in BHI-Medium mit Zusatz von 5 % Ethanol (Abb. 3.2) sind keine deutlichen Unterschiede zwischen dem Wildtyp EGD-e und den sRNA-Deletionsmutanten zu erkennen. Insgesamt ist der Kurvenverlauf bei allen getesteten Kandidaten im Vergleich zu Abb. 3.1 mit reinem BHI-Medium deutlich flacher. Während die Bakterien dort

schon nach sechs Tagen in die stationäre Phase eintreten, befinden sie sich im Medium mit Zusatz von Ethanol an Tag 6 noch in der Anlaufphase. Da sich auch nach zehn Tagen noch keine Unterschiede herauskristallisierten, wurde der Versuch analog zu dem in reinem BHI-Medium ebenfalls zu diesem Zeitpunkt beendet.



**Abb. 3.3** Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium mit Zusatz von 0,045 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 4 °C und 180 rpm.

Abb. 3.3 zeigt das Wachstum von Wildtyp und Deletionsmutanten in BHI-Medium mit Zusatz von 0,045 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Der Kurvenlauf ähnelt dem der Bakterien in reinem BHI-Medium. Im Gegensatz zu Ethanol wird die Wachstumsgeschwindigkeit durch Wasserstoffperoxid nicht beeinträchtigt. Auch in dieser Wachstumskurve lassen sich keine deutlichen Unterschiede im Wachstumsverhalten von Wildtyp und Deletionsmutanten feststellen. Lediglich die Mutante  $\Delta rli84$  wächst in der exponentiellen Phase etwas langsamer als die restlichen Kandidaten, zeigt aber in der Anlaufphase den gleichen Kurvenlauf und erreicht auch zeitgleich die stationäre Phase.

#### 3.1.1.2 Wachstum bei 15 °C

Als Kriterium für Kälte wurde für alle folgenden Versuche, insbesondere für den Kälteschock, eine Temperatur von 15 °C festgelegt. Es wurden deshalb neben den vorangegangenen Wachstumskurven bei 4 °C weitere bei 15 °C angefertigt. Die Untersuchung bezog 18 Deletionsmutanten ein, die mit dem Wildtyp EGD-e verglichen wurden. Die Wachstumskurven wurden über 54 h aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt



befanden sich die Bakterienkulturen in der stationären Phase bzw. schon in der Absterbephase, so dass keine signifikanten Unterschiede mehr zu erwarten waren. Zur besseren Übersicht sind die Kurven dieses Versuchs in zwei Diagrammen dargestellt.

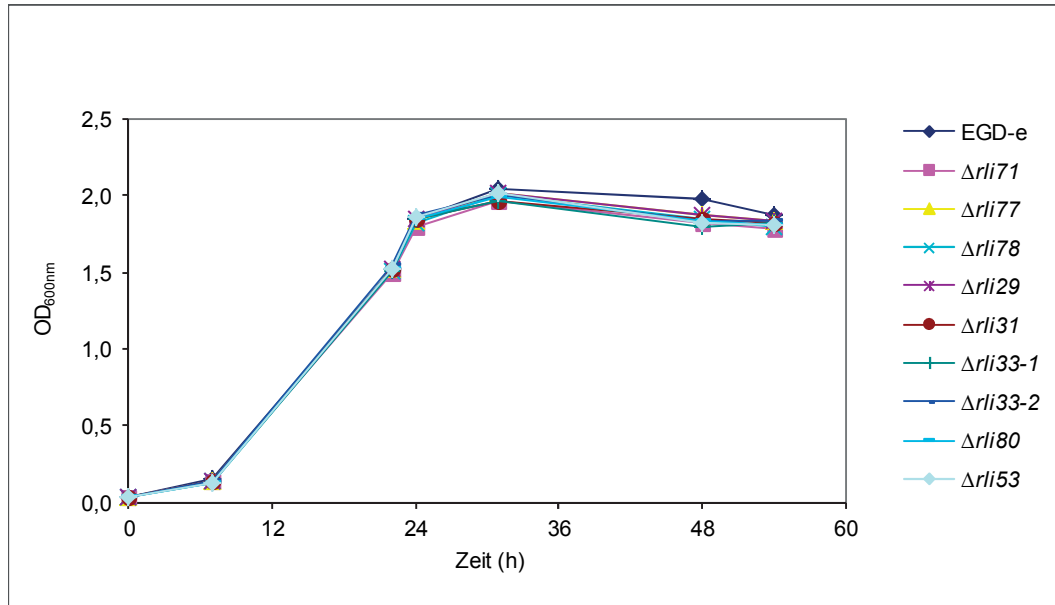


Abb. 3.4 Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium bei 15 °C und 180 rpm.

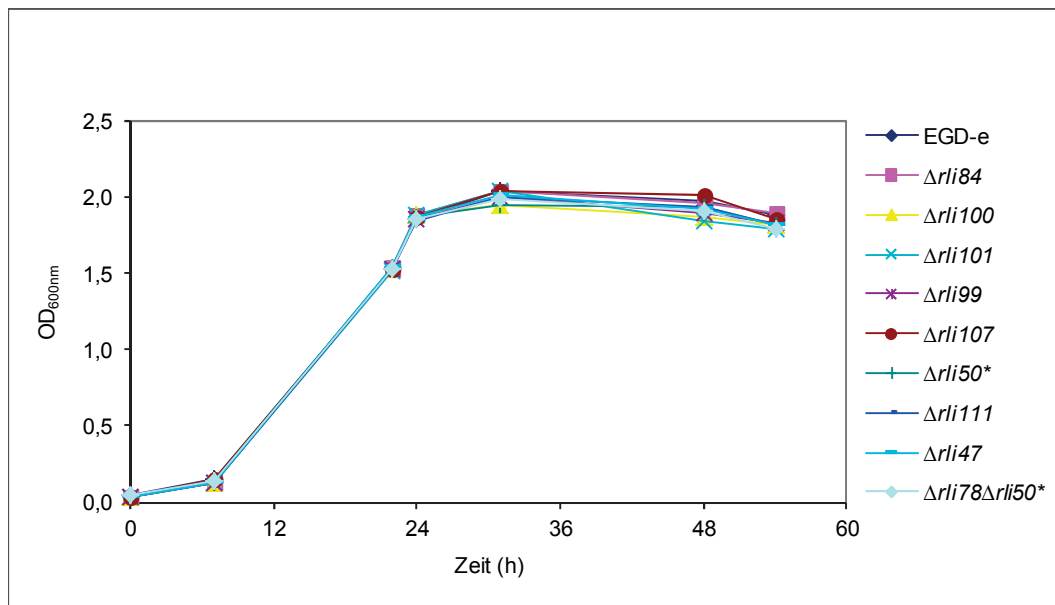
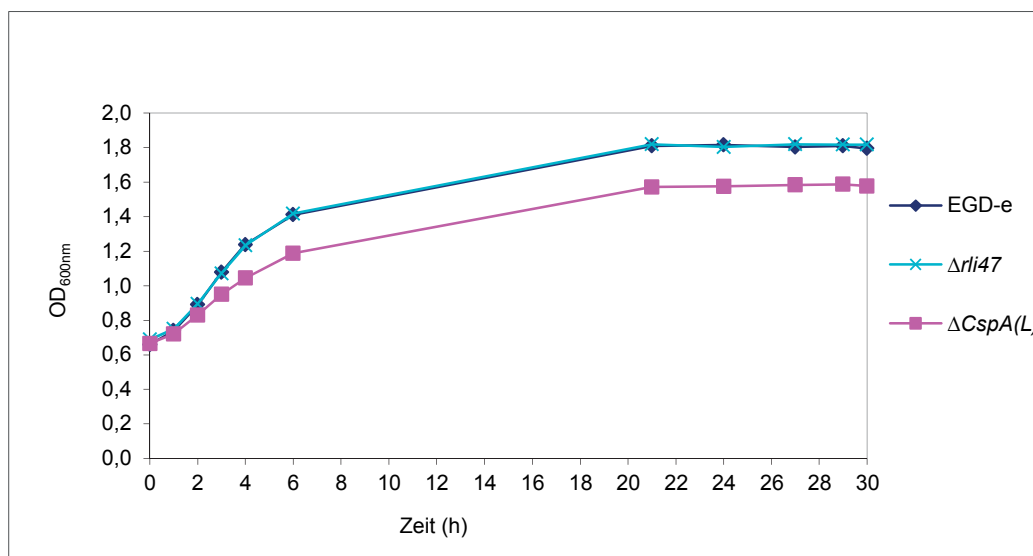


Abb. 3.5 Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium bei 15 °C und 180 rpm.

Die Wachstumskurven des Wildtyps und der sRNA-Deletionsmutanten in reinem BHI-Medium bei 15 °C, dargestellt in Abb. 3.4 und Abb. 3.5, verlaufen gleichförmig. Es gibt keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit. Alle getesteten Kandidaten zeigen sowohl in der Anlaufphase als auch in der exponentiellen Wachstumsphase einen dem Wildtyp nahezu identischen Verlauf und treten zeitgleich in die stationäre Phase ein.

### 3.1.1.3 Wachstum nach Kälteschock von 37 auf 15 °C

Kälteschock wurde in dieser Arbeit als ein plötzlicher Temperaturabfall von 37 auf 15 °C definiert. Für die sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  sollte untersucht werden, inwiefern sich ihr Wachstumsverhalten unmittelbar nach dem Kälteschock von dem des Wildtyps EGD-e unterscheidet. Dazu wurden die Bakterienkulturen bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,6 wachsen gelassen, in 15 s auf 15 °C heruntergekühlt und anschließend bei einer Inkubationstemperatur von 15 °C weiter wachsen gelassen. Der erste Messwert wurde zum Zeitpunkt unmittelbar nach dem Kälteschock aufgenommen.



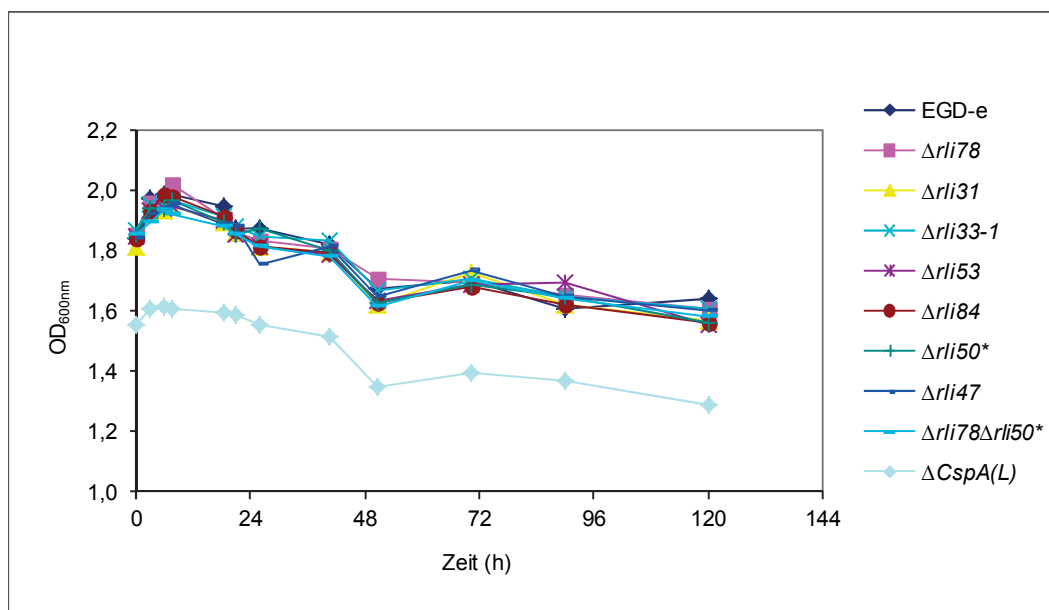
**Abb. 3.6** Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und der sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  bei 15 °C und 180 rpm nach Kälteschock von 37 auf 15 °C.

In Abb. 3.6 ist das Wachstum der sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  im Vergleich zum Wildtyp EGD-e dargestellt. Als Negativkontrolle wurde außerdem die Deletionsmutante  $\Delta CspA(L)$  mit aufgenommen, in der das Kälteschockprotein A deletiert ist, das für das

Wachstum bei Kälte benötigt wird. Die sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  zeigt in allen Wachstumsphasen die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit und einen identischen Kurvenverlauf wie der Wildtyp. Die Wachstumsgeschwindigkeit von  $\Delta CspA(L)$  ist deutlich langsamer als die von Wildtyp und  $\Delta rli47$ .

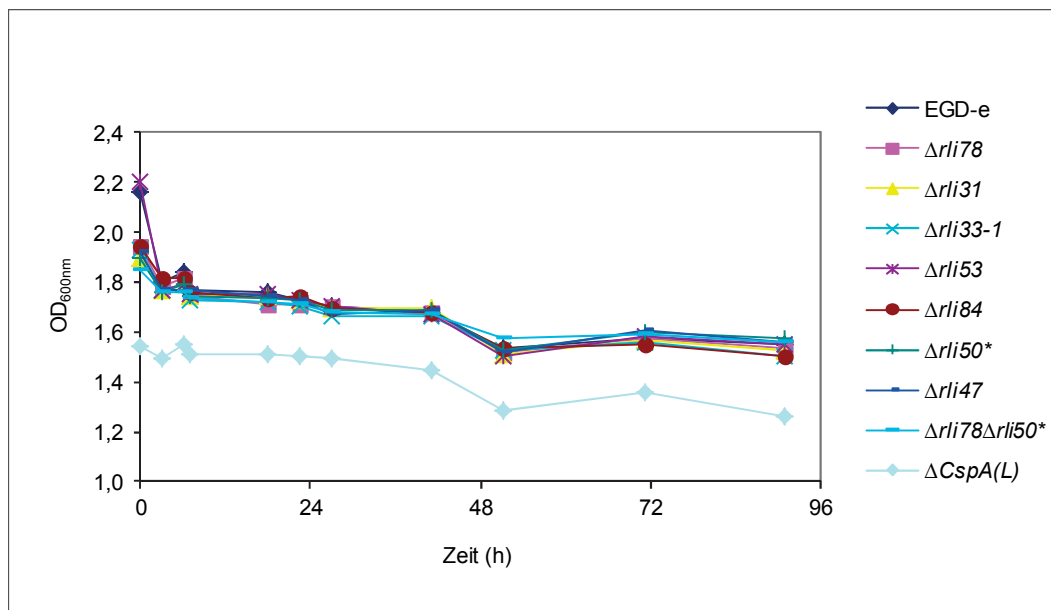
#### 3.1.1.4 Wachstum 24 h nach Kälteschock unter Stressbedingungen

Einige sRNAs waren nach den Daten der RNA-Sequenzierung vor allem zum Zeitpunkt 24 h nach Kälteschock sehr stark hoch- oder herunterreguliert. Deshalb wurden für acht ausgewählte Kandidaten Wachstumskurven erstellt, die genau zu diesem Zeitpunkt starteten. Die Kulturen wurden also zunächst bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,6 bei 37 °C wachsen gelassen, abrupt auf 15 °C abgekühlt und anschließend für 24 h bei 15 °C weiter wachsen gelassen. Von diesem Startpunkt aus wurden die Wachstumskurven über 5 Tage hinweg aufgenommen, während denen die Kulturen weiterhin bei 15 °C und 180 rpm inkubiert wurden. Es wurden parallel drei Varianten des Versuchs durchgeführt: in reinem BHI-Medium ohne Zusätze, in BHI-Medium mit 5 % Ethanol und in BHI-Medium mit 0,045 % Wasserstoffperoxid. Bei allen Experimenten diente der Wildtyp EGD-e als Referenz und die Deletionsmutante  $\Delta CspA(L)$  als Negativkontrolle.

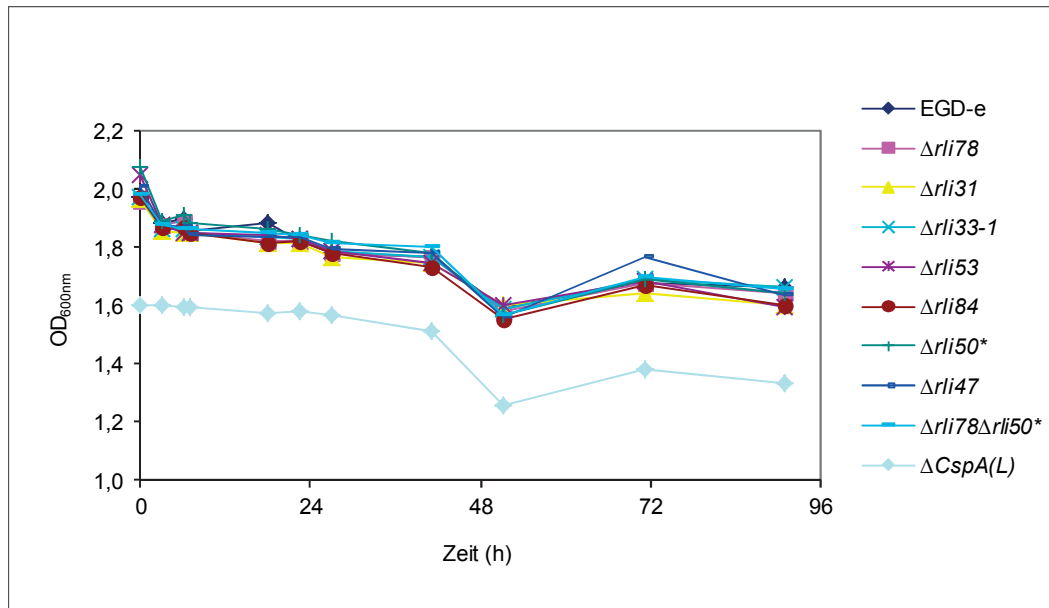


**Abb. 3.7** Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium bei 15 °C und 180 rpm 24 h nach Kälteschock von 37 auf 15 °C.

In Abb. 3.7 ist das Wachstum des Wildtyps EGD-e und der sRNA-Deletionsmutanten in reinem BHI-Medium 24 h nach dem Kälteschock dargestellt. Da die Bakterienkulturen vor Aufnahme der Wachstumskurven schon 24 h gewachsen sind, befinden sie sich bereits in der stationären Phase bzw. in der Absterbephase. Es ist zunächst bei allen getesteten Kandidaten ein kleiner Anstieg der  $OD_{600nm}$  zu erkennen, d.h. es findet nochmal kurzzeitig Bakterienwachstum statt. Nachdem bei einer  $OD_{600nm}$  von ungefähr 2,0 (bzw. 1,6 für  $\Delta CspA(L)$ ) das Maximum erreicht ist, fällt die  $OD_{600nm}$  der Bakterienkultur mit kleineren Schwankungen immer weiter ab. Die Kurvenverläufe der sRNA-Deletionsmutanten unterscheiden sich nicht wesentlich von dem des Wildtyps EGD-e. Die Negativkontrolle  $\Delta CspA(L)$  bleibt wie erwartet im Wachstum deutlich hinter den anderen Kandidaten zurück, die Kurve verläuft jedoch parallel. Da keine weiteren Veränderungen mehr zu erwarten waren, wurde der Versuch nach 5 Tagen beendet.



**Abb. 3.8** Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium mit 5 % Ethanol bei 15 °C und 180 rpm 24 h nach Kälteschock von 37 auf 15 °C.

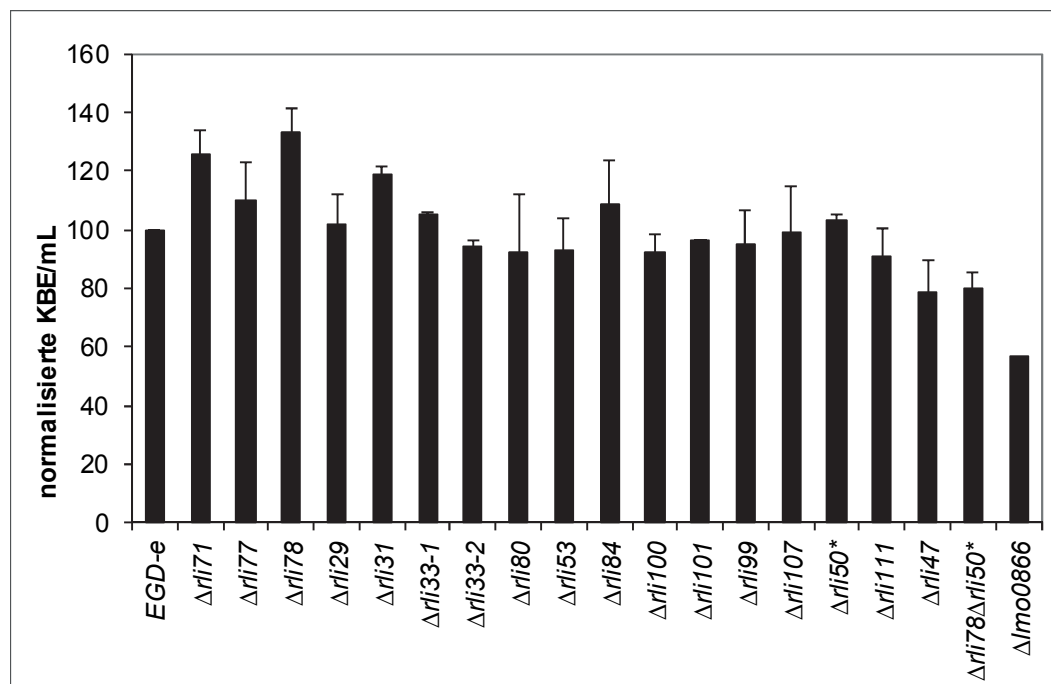


**Abb. 3.9** Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium mit 0,045 %  $H_2O_2$  bei 15 °C und 180 rpm 24 h nach Kälteschock von 37 auf 15 °C.

Die Wachstumskurven in Abb. 3.8 und Abb. 3.9 wurden in BHI-Medium mit Zusatz von 5 % Ethanol bzw. 0,045 % Wasserstoffperoxid aufgenommen. Wie in Abb. 3.7 befinden sich die Bakterien bereits in der Absterbephase. Im Unterschied zum Wachstum in reinem BHI-Medium ist hier jedoch kein initialer Anstieg der  $OD_{600nm}$  zu beobachten. Auch hier zeigen die sRNA-Deletionsmutanten ein nahezu gleiches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp EGD-e.

### 3.1.2 Kälteschockversuch

In den vorangegangenen Versuchen wurde das Wachstumsverhalten der sRNA-Deletionsmutanten anhand von Wachstumskurven untersucht. Die Messung des Bakterienwachstums erfolgte dabei mit einem Spektralphotometer, das mittels der Absorption bei einer definierten Wellenlänge die optische Dichte einer Bakterienkultur misst. Dieses Verfahren lässt jedoch keine direkten Rückschlüsse auf die genaue Bakterienzahl zu. Um eine genaue Bakterienzahl zu ermitteln, wurden die Bakterien zum Zeitpunkt 2 h nach Kälteschock (nach Inkubation bei 15 °C und 180 rpm) auf BHI-Agarplatten ausplattiert und die koloniebildenden Einheiten gezählt. Der Versuch wurde, mit Ausnahme der Negativkontrolle  $\Delta lmo0866$ , zweimal wiederholt.

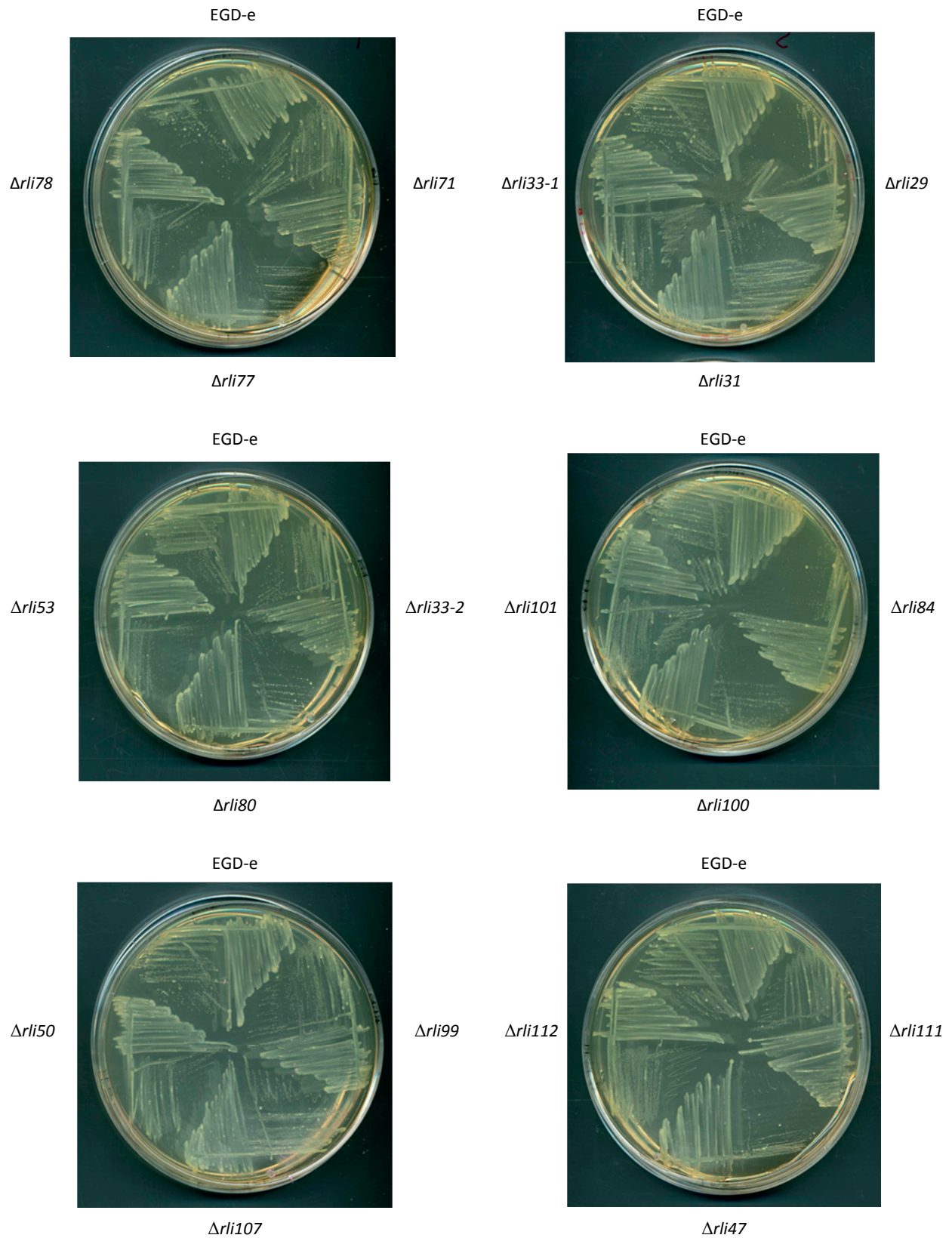


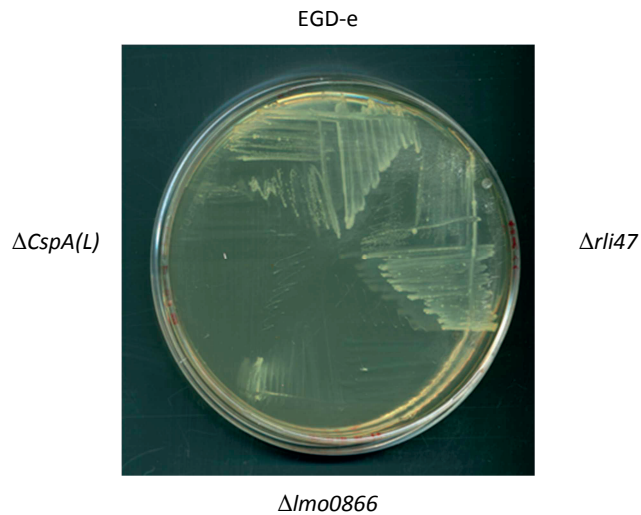
**Abb. 3.10** Normalisierte KBE/ml von EGD-e und sRNA-Mutanten nach Wachstum bei 15 °C für 2 h nach Kälteschock

In Abb. 3.10 sind die KBE/ml der sRNA-Deletionsmutanten in Relation zum Wildtyp EGD-e dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp EGD-e zeigen besonders die Mutanten  $\Delta rli71$ ,  $\Delta rli78$  und  $\Delta rli31$  eine erhöhte Bakteriendichte 2 h nach Kälteschock. Abgeschwächtes Wachstum zu diesem Zeitpunkt zeigen im Vergleich zum Wildtyp die Mutanten  $\Delta rli47$  und  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  sowie die Negativkontrolle  $\Delta lmo0866$ . Das Wachstum der Mutante  $\Delta rli33-2$  ist leicht abgeschwächt. Die übrigen Mutanten bewegen sich im Bereich der KBE/ml des Wildtyps.

### 3.1.3 Wachstum auf Platte

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Deletion bestimmter sRNAs einen Einfluss auf das Wachstum von *L. monocytogenes* auf festem Medium hat. Das Wachstum von EGD-e und den sRNA-Deletionsmutanten wurde auf BHI-Agarplatten bei verschiedenen Temperaturen getestet. Dazu wurde eine Kolonie der Stämme in jeweils einem Quadranten auf der Platte ausgestrichen. Der Wildtyp EGD-e wurde als Referenz auf jeder Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C für 1 Tag, bei 15 °C für 2 Tage und bei 4 °C für 30 Tage inkubiert. Der Versuch wurde jeweils dreimal wiederholt. Es wird exemplarisch das Bild eines Versuchs gezeigt. Die Bilder der Platten, die bei 37 °C inkubiert wurden, sind nicht gezeigt.





**Abb. 3.11** Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf BHI-Agarplatten bei 15 °C für 2 Tage.

Bei den getesteten sRNA-Deletionsmutanten zeigen sich beim Wachstum auf BHI-Agarplatten bei einer Inkubationstemperatur von 15 °C keine Unterschiede hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp EGD-e. Auch die Morphologie der einzelnen Kolonien weist keine Auffälligkeiten auf. Als Negativkontrollen zeigen die Mutanten  $\Delta CspA(L)$  und  $\Delta lmo0866$ , eine RNA-Helikase, deutlich eingeschränktes, verlangsamtes Wachstum.



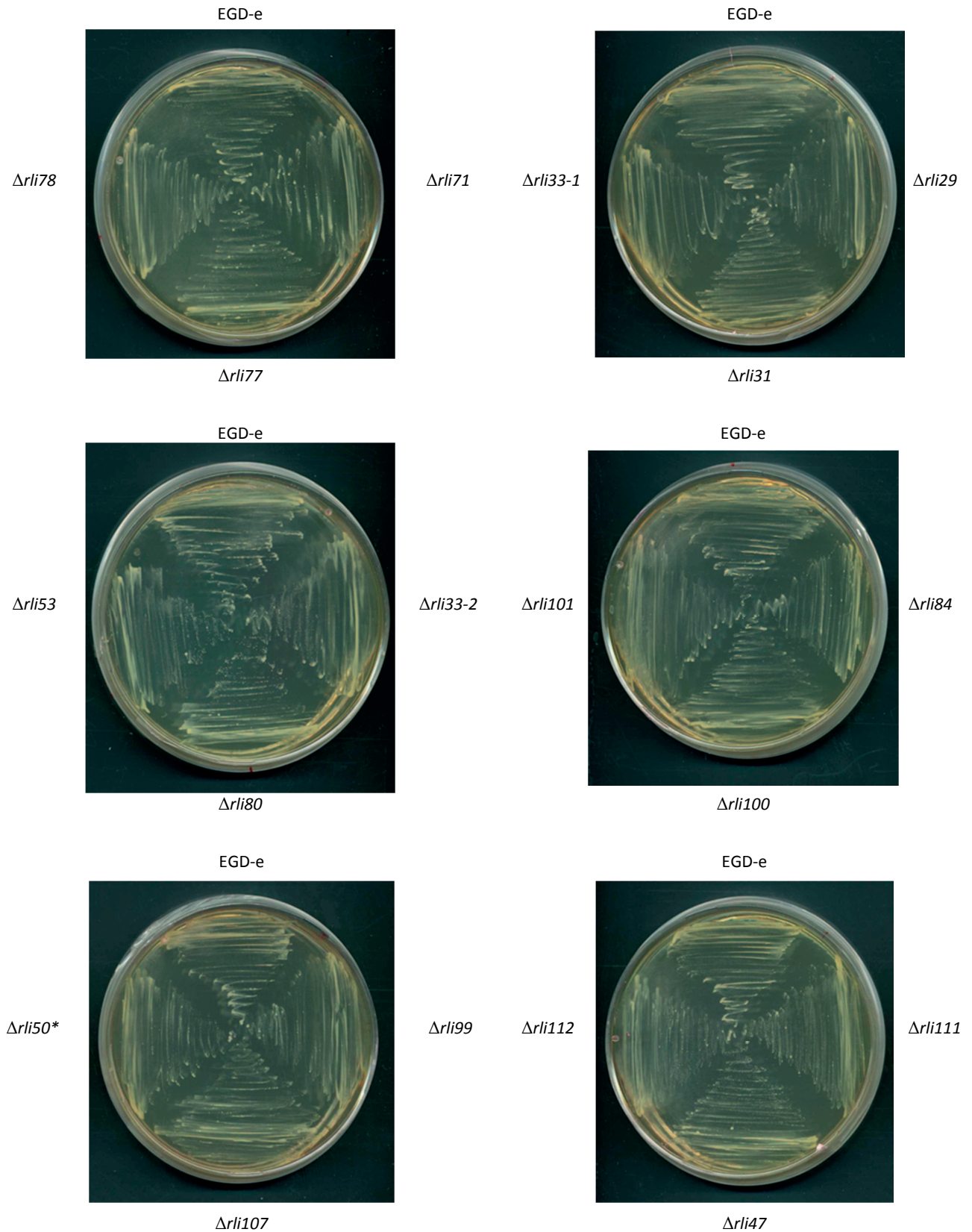


Abb. 3.12 Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf BHI-Agarplatten bei 4 °C für 30 Tage.

Bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C ist das Wachstum von *L. monocytogenes* auf BHI-Agarplatten im Vergleich zu 37 und 15 °C deutlich verlangsamt. Es wurde deshalb eine Inkubationsdauer von 30 Tagen gewählt. Keine der untersuchten sRNA-Mutanten ist im Wachstum hinter dem Wildtyp EGD-e zurückgeblieben. Eine morphologische Betrachtung der Kolonien ergibt ebenfalls keine Auffälligkeiten.

### 3.1.4 Schwärmverhalten auf Weichagar

Die Beweglichkeit von Bakterien lässt sich auf Weichagar gut untersuchen. Dazu wurden die Bakterienkolonien mit einem Zahnstocher in den Weichagar gestochen und der Radius der geschwärmten Bakterien als Maß für die Motilität nach einer bestimmten Inkubationszeit gemessen. Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob bzw. wie die Deletion einzelner sRNAs die Motilität von *L. monocytogenes* beeinflusst. Die ermittelten Werte der sRNA-Mutanten wurden in Relation zum Wildtyp EGD-e gesetzt. Als Negativkontrolle diente die Mutante  $\Delta flaA$ . Durch die Deletion des Gens, das für Flagellin kodiert, ist diese Mutante kaum beweglich.

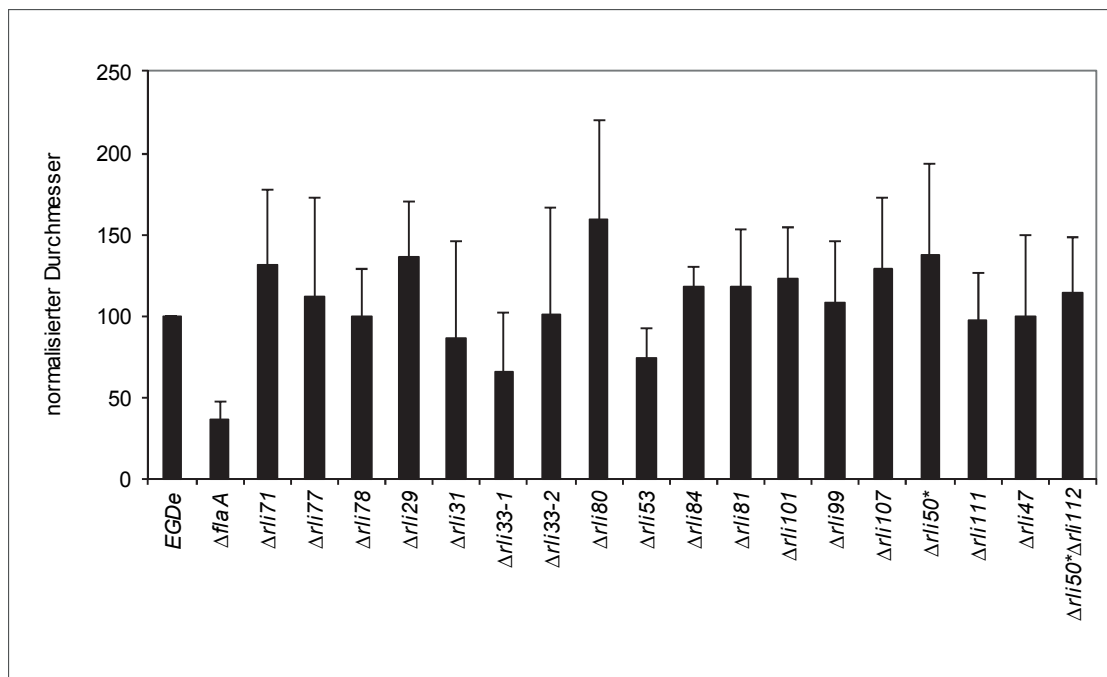
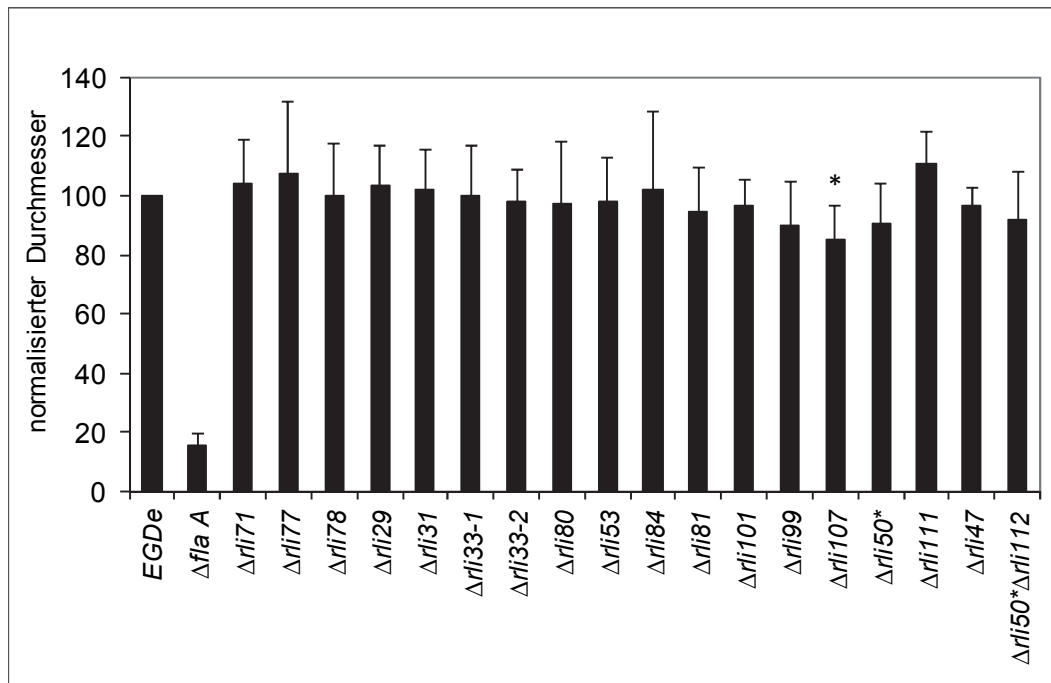


Abb. 3.13 Schwärmverhalten von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf Weichagar bei 37 °C für 2 Tage.

Alle in Abb. 3.13 aufgeführten sRNA-Deletionsmutanten sind – genau wie der Wildtyp – bei 37 °C auf Weichagar beweglich. In den einzelnen Versuchen zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp EGD-e teilweise große Unterschiede im Schwärmverhalten. Allerdings waren auch die Schwankungen zwischen den Versuchswiederholungen so groß, dass die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind.



**Abb. 3.14** Schwärmverhalten von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf Weichagar bei 15 °C für 5 Tage.

In Abb. 3.14 ist das Schwärmverhalten der sRNA-Deletionsmutanten in Relation zum Wildtyp EGD-e nach fünftägiger Inkubationszeit bei 15 °C aufgetragen. Sowohl der Wildtyp als auch alle Mutanten sind bei 15 °C beweglich. Die sRNA-Deletionsmutante *Δrli107* zeigt einen signifikant niedrigeren Wert als der Wildtyp. Die Motilität von *L. monocytogenes* wird also durch die Deletion der sRNA *rli107* beeinträchtigt. Alle anderen getesteten sRNAs haben keinen signifikanten Einfluss auf das Schwärmverhalten auf Weichagar bei 15 °C.

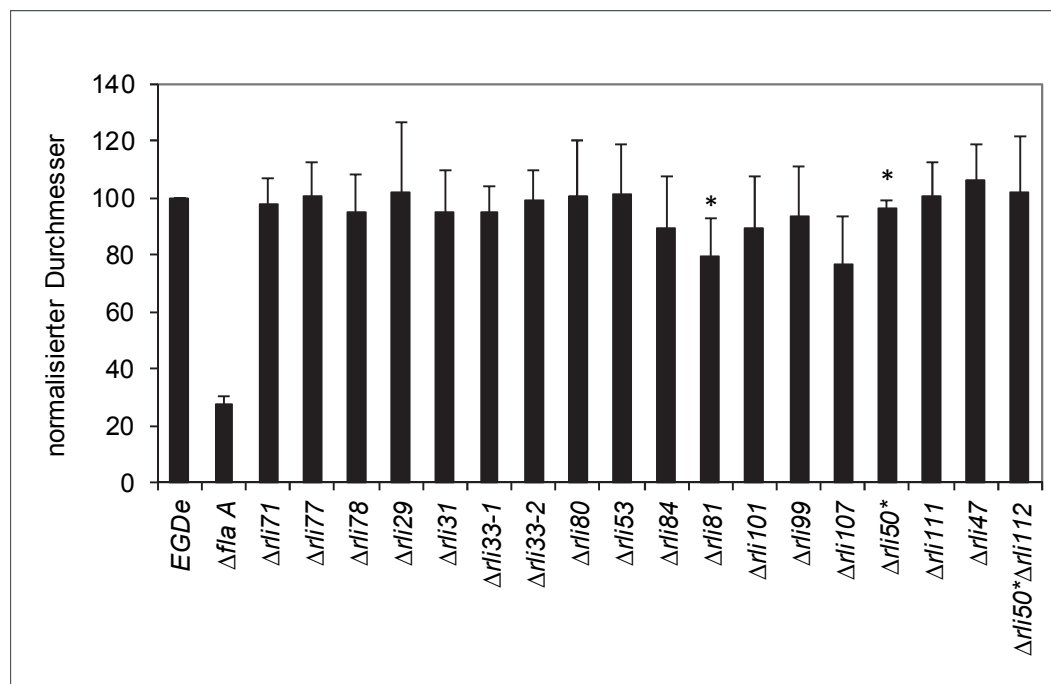


Abb. 3.15 Schwärmverhalten von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf Weichagar bei 4 °C für 30 Tage.

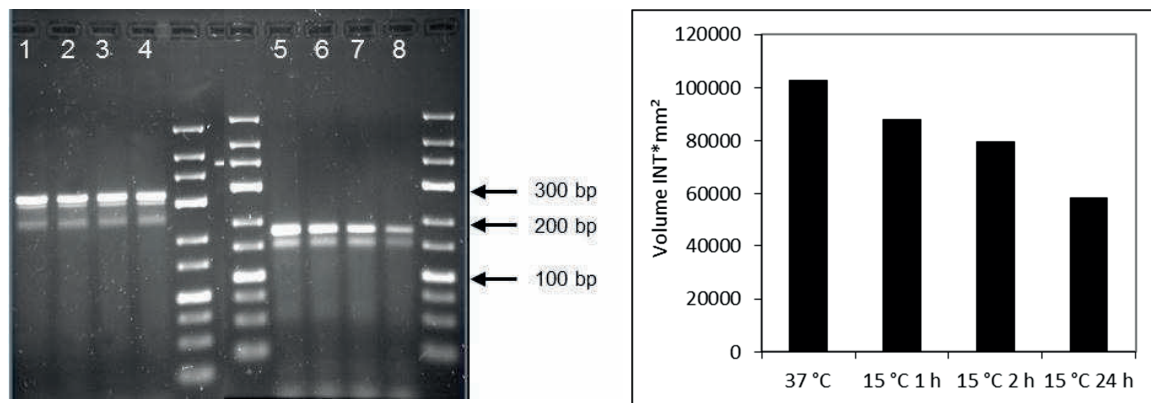
Wie in Abb. 3.15 dargestellt, sind auch bei 4 °C der Wildtyp und alle Mutanten beweglich. Allerdings ist das Wachstum bei dieser Temperatur auf Weichagar genau wie in Flüssigmedium langsamer, weshalb eine längere Inkubationszeit von 30 Tagen gewählt wurde. Eine Deletion der sRNAs *rli81* und *rli50\** führt gegenüber dem Wildtyp EGD-e zu einer signifikant eingeschränkten Beweglichkeit. Die Unterschiede im Schwärmverhalten der restlichen sRNA-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp sind nicht signifikant, wobei die Mutante *Δrli107* noch vergleichsweise deutlich zurückbleibt.

## 3.2 RNA-Analyse

### 3.2.1 RT-PCR

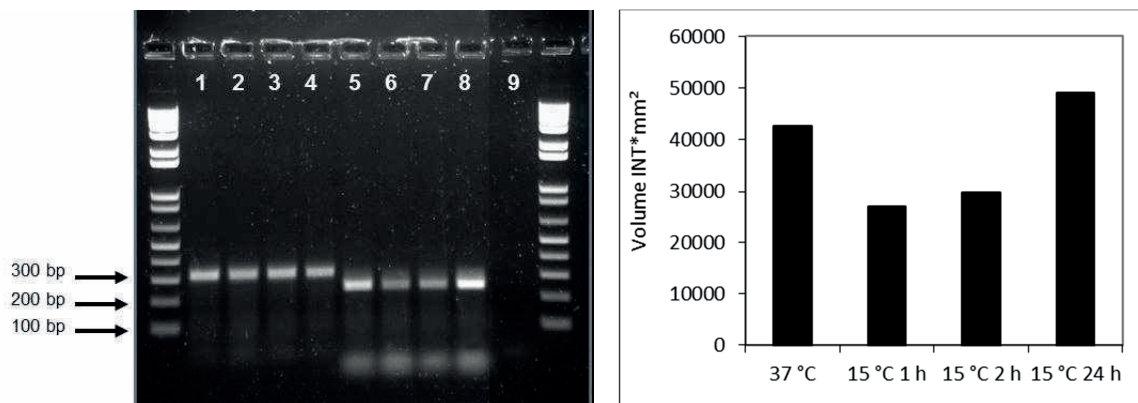
Durch die Analyse der Gelbilder nach der RT-PCR soll die Expression der getesteten sRNAs veranschaulicht werden. Unterschiedlich stark sichtbare Banden zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Kälteschock stehen für die Menge an RNA, die vorhanden ist. Es wurde jeweils die Gesamt-RNA zu den vier untersuchten Zeitpunkten isoliert. Als Template wurde die gleiche Menge an RNA eingesetzt, so dass die Vergleichbarkeit der Banden gegeben ist. Um den rein optischen Vergleich der

Bandendichte zu objektivieren und quantifizieren, wurde die Intensität der Banden mit dem Geldokumentationssystem (BioRad) gemessen. Nachfolgend sind jeweils exemplarisch ein Gelbild und das zugehörige Diagramm mit der Intensität der Banden gegenübergestellt. Die Haushalts-sRNA 16S rRNA diente jeweils als Referenz. Sie wird zu jedem Untersuchungszeitpunkt konstant exprimiert, das heißt die Intensität der Banden sollte ungefähr gleich stark sein. Als Negativkontrolle wurde statt RNA als Template H<sub>2</sub>O mit den 16S-Primern eingesetzt.



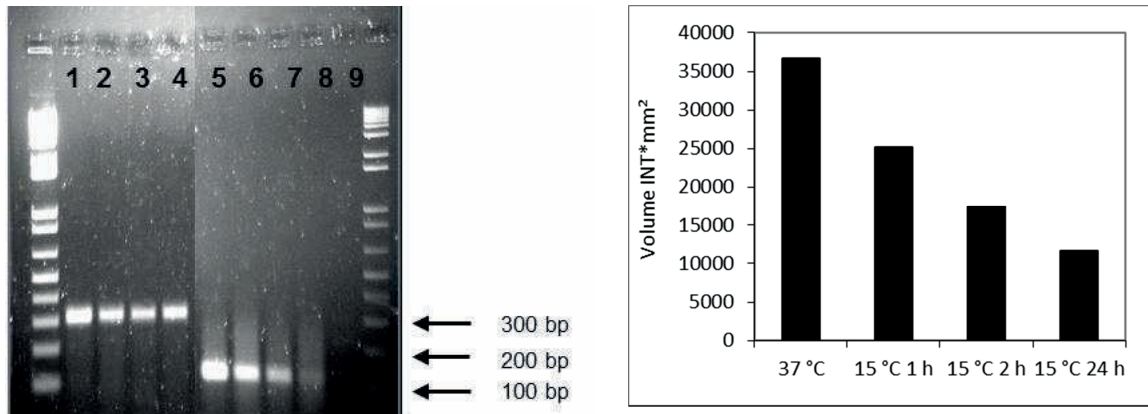
**Abb. 3.16 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und *rli44* (175 bp)**

links: (1) 16S rRNA 37 °C (2) 16S rRNA 15 °C 1 h (3) 16S rRNA 15 °C 2 h (4) 16S rRNA 15 °C 24 h (5) *rli44* 37 °C (6) *rli44* 15 °C 1 h (7) *rli44* 15 °C 2 h (8) *rli44* 15 °C 24 h  
rechts: Messung der Intensität der Banden für *rli44*



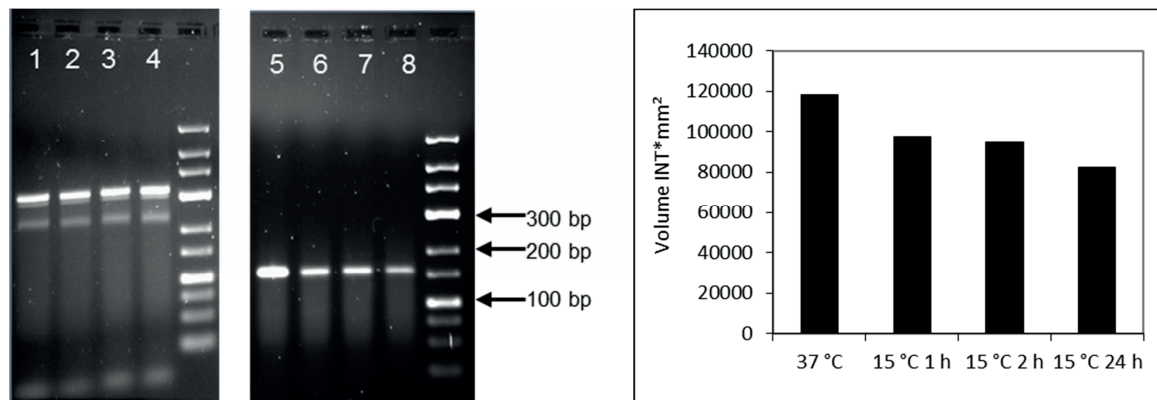
**Abb. 3.17 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und *rli47* (249 bp)**

links: (1) 16S rRNA 37 °C (2) 16S rRNA 15 °C 1 h (3) 16S rRNA 15 °C 2 h (4) 16S rRNA 15 °C 24 h (5) *rli47* 37 °C (6) *rli47* 15 °C 1 h (7) *rli47* 15 °C 2 h (8) *rli47* 15 °C 24 h (9) H<sub>2</sub>O + 16S  
rechts: Messung der Intensität der Banden für *rli47*



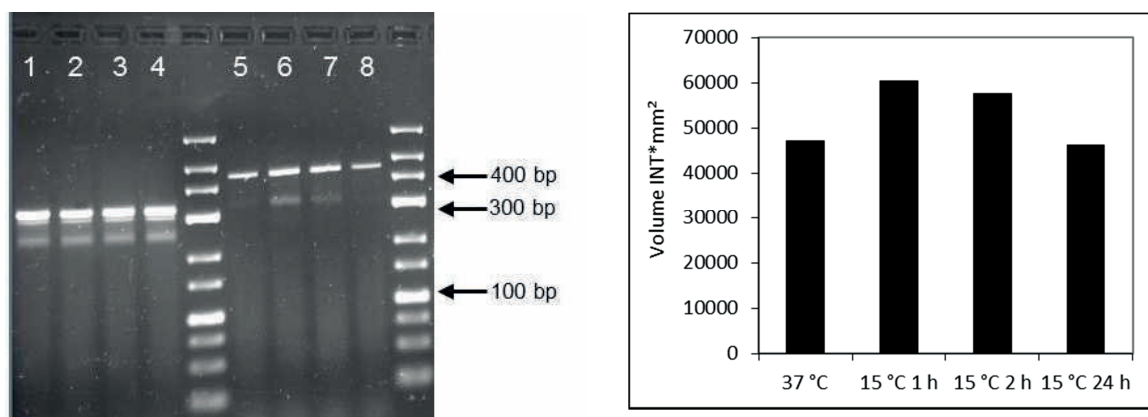
**Abb. 3.18 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und *rli78* (123 bp)**

links: (1) 16S rRNA 37 °C (2) 16S rRNA 15 °C 1 h (3) 16S rRNA 15 °C 2 h (4) 16S rRNA 15 °C 24 h (5) *rli78* 37 °C (6) *rli78* 15 °C 1 h (7) *rli78* 15 °C 2 h (8) *rli78* 15 °C 24 h (9) H<sub>2</sub>O + 16S  
rechts: Messung der Intensität der Banden für *rli78*



**Abb. 3.19 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und FMN (156 bp)**

links: (1) 16S rRNA 37 °C (2) 16S rRNA 15 °C 1 h (3) 16S rRNA 15 °C 2 h (4) 16S rRNA 15 °C 24 h (5) FMN 37 °C (6) FMN 15 °C 1 h (7) FMN 15 °C 2 h (8) FMN 15 °C 24 h  
rechts: Messung der Intensität der Banden für FMN



**Abb. 3.20 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und *ssrA* (442 bp)**

links: (1) 16S rRNA 37 °C (2) 16S rRNA 15 °C 1 h (3) 16S rRNA 15 °C 2 h (4) 16S rRNA 15 °C 24 h (5) *ssrA* 37 °C (6) *ssrA* 15 °C 1 h (7) *ssrA* 15 °C 2 h (8) *ssrA* 15 °C 24 h  
rechts: Messung der Intensität der Banden für *ssrA*



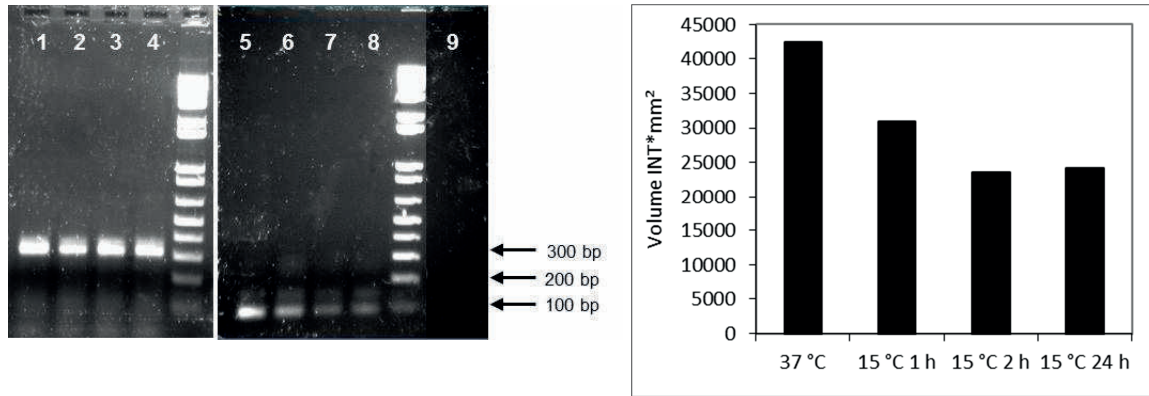


Abb. 3.21 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und *ssrS* (94 bp)

links: (1) 16S rRNA 37 °C (2) 16S rRNA 15 °C 1 h (3) 16S rRNA 15 °C 2 h (4) 16S rRNA 15 °C 24 h (5) *ssrS* 37 °C (6) *ssrS* 15 °C 1 h (7) *ssrS* 15 °C 2 h (8) *ssrS* 15 °C 24 h (9) H<sub>2</sub>O + 16S  
rechts: Messung der Intensität der Banden für *ssrS*

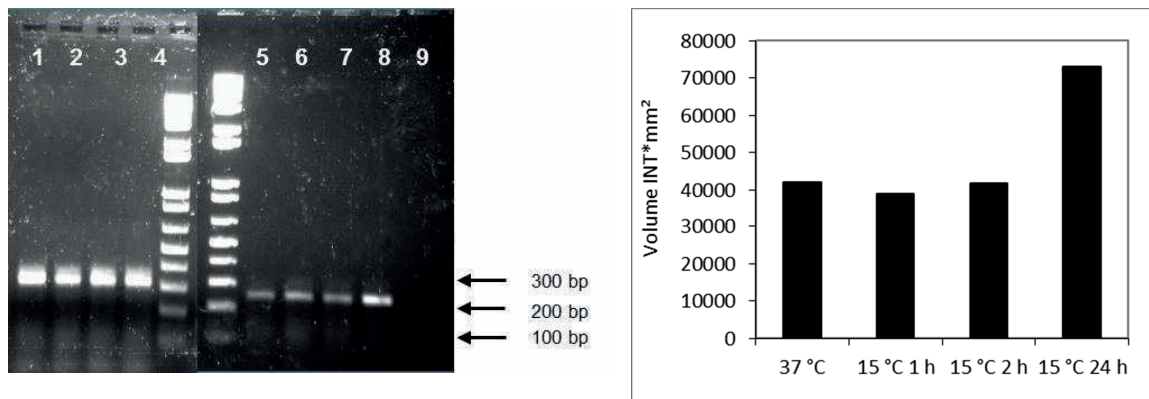


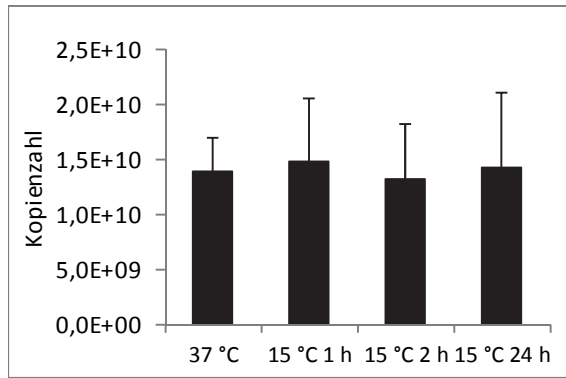
Abb. 3.22 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und *rnpB* (245 bp)

links: (1) 16S rRNA 37 °C (2) 16S rRNA 15 °C 1 h (3) 16S rRNA 15 °C 2 h (4) 16S rRNA 15 °C 24 h (5) *rnpB* 37 °C (6) *rnpB* 15 °C 1 h (7) *rnpB* 15 °C 2 h (8) *rnpB* 15 °C 24 h (9) H<sub>2</sub>O + 16S  
rechts: Messung der Intensität der Banden für *rnpB*

### 3.2.2 Quantitative Realtime-PCR

Mit der quantitativen Real-Time-PCR kann die Expression ausgewählter sRNAs dargestellt werden. Im Vergleich zur Analyse der Banden nach RT-PCR im vorherigen Abschnitt liefert die qRT-PCR genauere und exakt quantifizierbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse der qRT-PCR (links) werden mit den Daten der RNA-Sequenzierung (RNA-Seq, rechts) verglichen und sind in der folgenden Abbildung für die jeweiligen Mutanten gegenübergestellt. Die Ergebnisse der qRT-PCR beruhen auf drei biologischen Versuchen, während die Diagramme der RNA-Seq-Daten (rc = read counts) die Analyse eines Versuches darstellen.



Für die Haushalts-RNA 16S rRNA liegt keine Analyse mit RNA-Seq vor.

Abb. 3.23 qRT-PCR von 16S rRNA

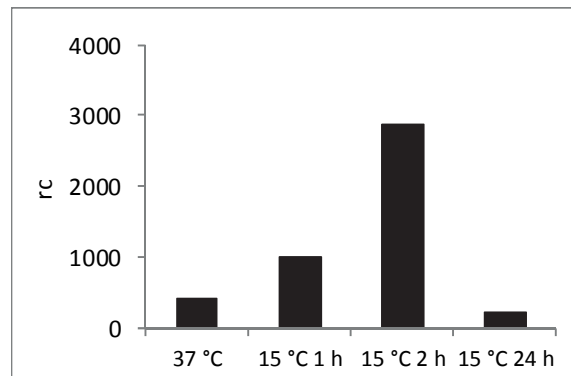
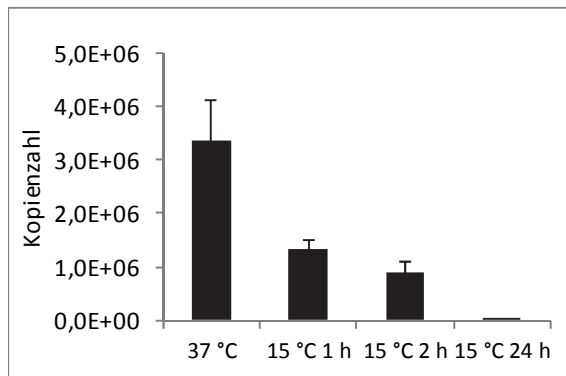


Abb. 3.24 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von *rli44* mit RNA-Seq

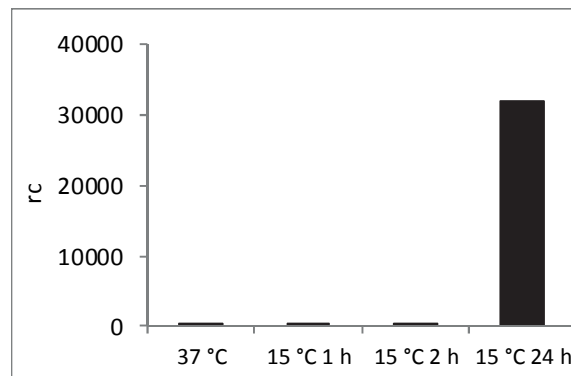
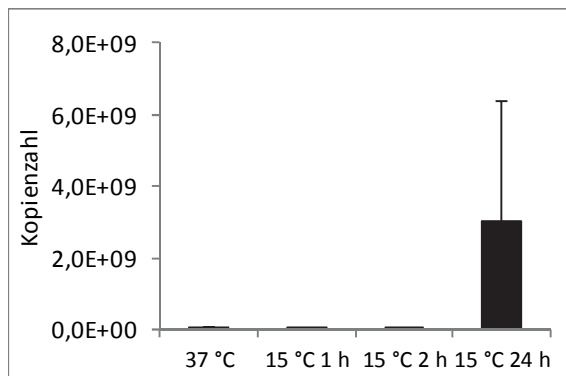


Abb. 3.25 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCT von *rli47* mit RNA-Seq



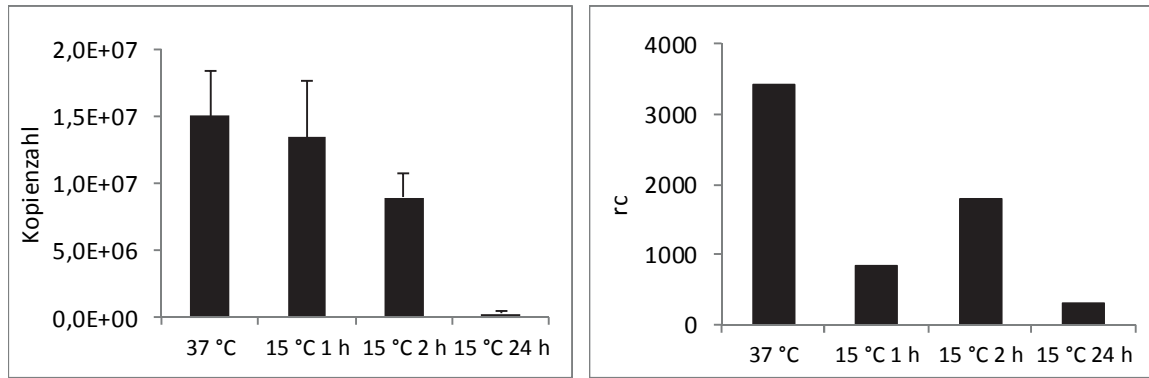


Abb. 3.26 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von *rli78* mit RNA-Seq

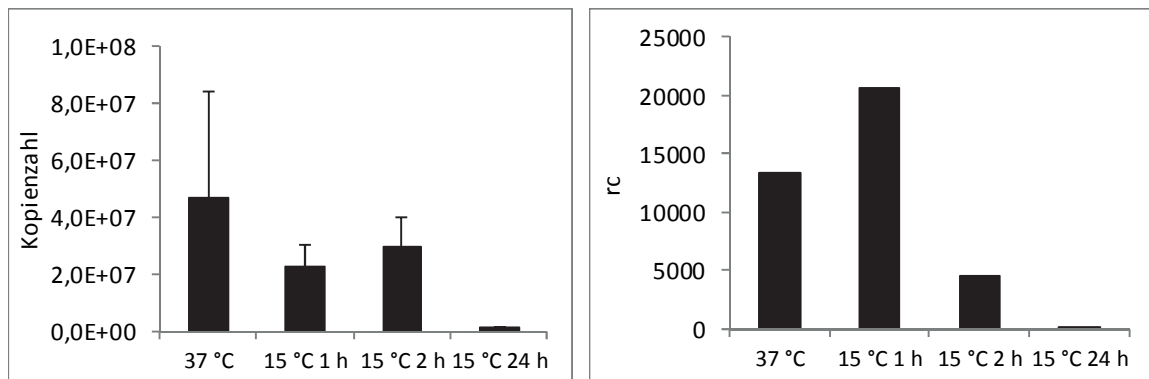


Abb. 3.27 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von *FMN* mit RNA-Seq

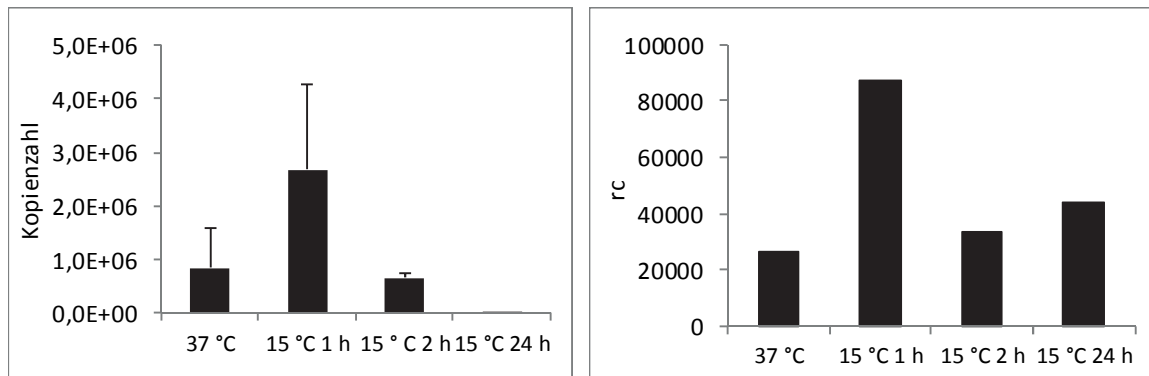


Abb. 3.28 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von *ssrA* mit RNA-Seq

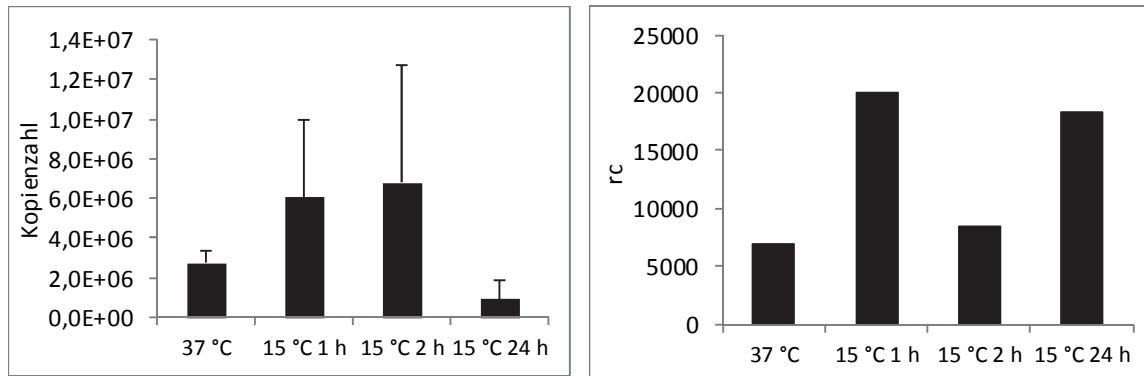


Abb. 3.29 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von *ssrS* mit RNA-Seq

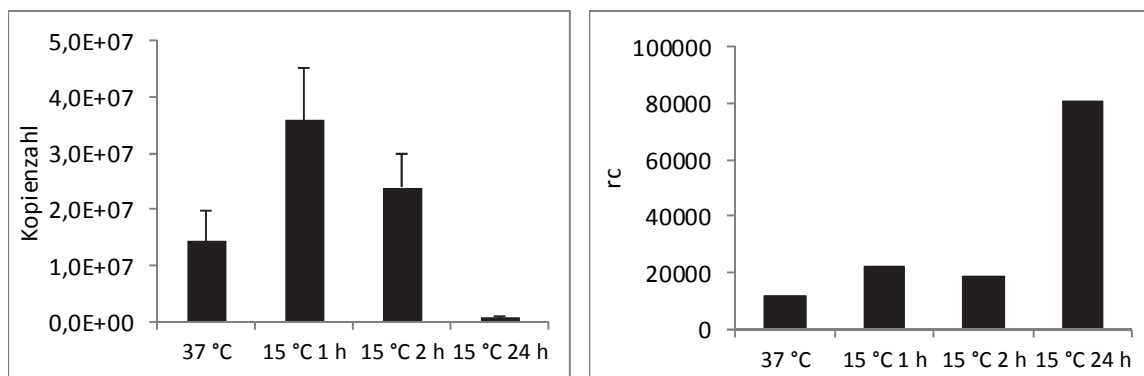


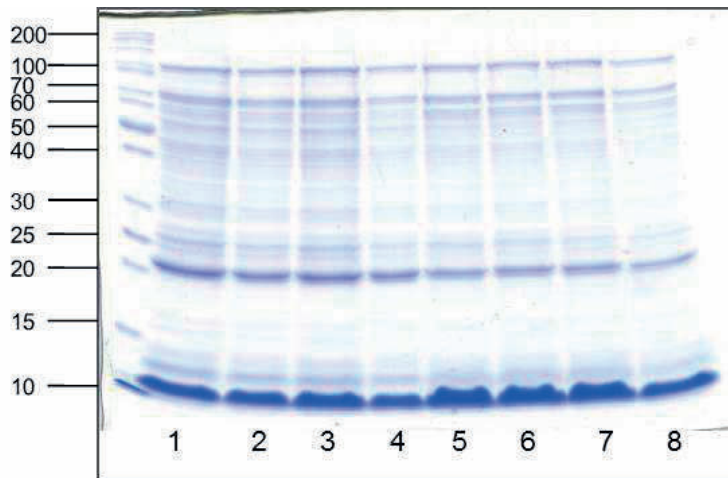
Abb. 3.30 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von *rnpB* mit RNA-Seq

### 3.3 Proteinanalytik

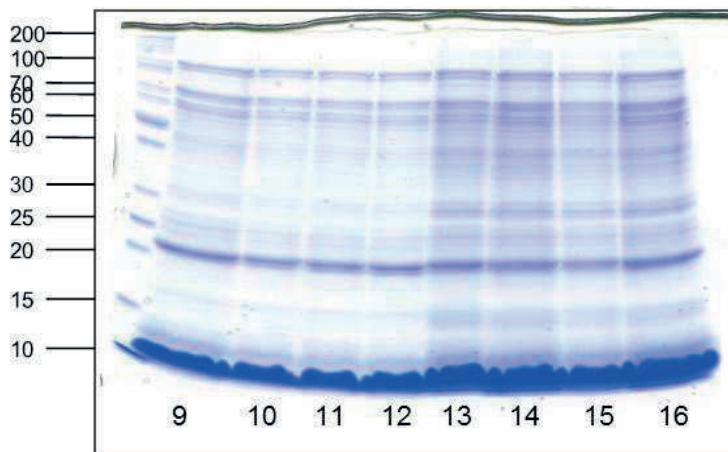
Durch die Isolierung von Zellwand-, Überstands- und zytoplasmatischen Proteinen lässt sich die Proteinexpression von *L. monocytogenes* umfassend untersuchen. Durch den Vergleich der Expressionsmuster, dargestellt durch Banden auf Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen, lassen sich Unterschiede in der Proteinsynthese des Wildtyps EGD-e und der sRNA-Deletionsmutanten aufdecken. Untersucht wurden die vier sRNA-Deletionsmutanten  $\Delta rli78$ ,  $\Delta rli50^*$ ,  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  und  $\Delta rli47$ . Alle drei Proteinfraktionen wurden für EGD-e und die Mutanten zu vier verschiedenen Zeitpunkten isoliert: aus Bakterienkulturen, die bei 37 °C gewachsen waren und zu drei Zeitpunkten (1 h, 2 h und 24 h) nach dem Kälteschock von 37 auf 15 °C. Aus dem Vergleich der Bandenmuster zwischen den verschiedenen Zeitpunkten einerseits und zwischen Wildtyp und Mutanten andererseits lassen sich zwei Beobachtungen ableiten:

1. Hat der Kälteschock einen Einfluss auf die Proteinsynthese von *L. monocytogenes*?
2. Sind bestimmte sRNAs an der Proteinsynthese von *L. monocytogenes* nach dem Kälteschock beteiligt?

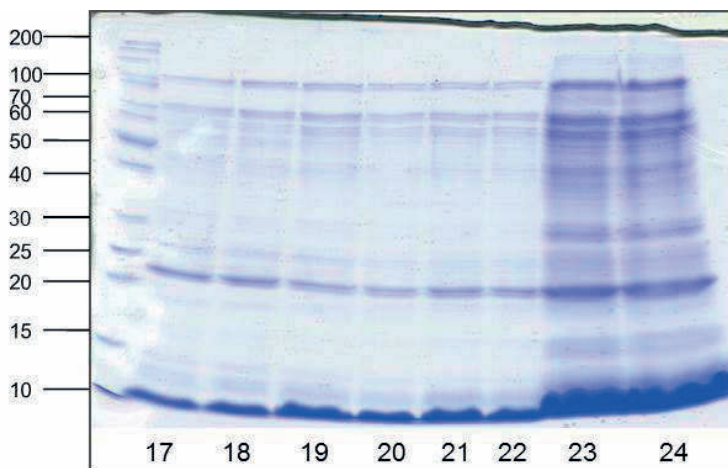
### 3.3.1 Zellwandproteine



- 1) EGD-e 37 °C
  - 2)  $\Delta rli78$  37 °C
  - 3)  $\Delta rli50^*$  37 °C
  - 4)  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  37 °C
  - 5) EGD-e 15 °C 1 h
  - 6)  $\Delta rli78$  15 °C 1 h
  - 7)  $\Delta rli50^*$  15 °C 1 h
  - 8)  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  15 °C 1 h
- aufgetragene Menge Protein  
pro Spur: 10  $\mu$ g



- 9) EGD-e 15 °C 2 h
  - 10)  $\Delta rli78$  15 °C 2 h
  - 11)  $\Delta rli50^*$  15 °C 2 h
  - 12)  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  15 °C 2 h
  - 13) EGD-e 15 °C 24 h
  - 14)  $\Delta rli78$  15 °C 24 h
  - 15)  $\Delta rli50^*$  15 °C 24 h
  - 16)  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  15 °C 24 h
- aufgetragene Menge Protein  
pro Spur: 10  $\mu$ g



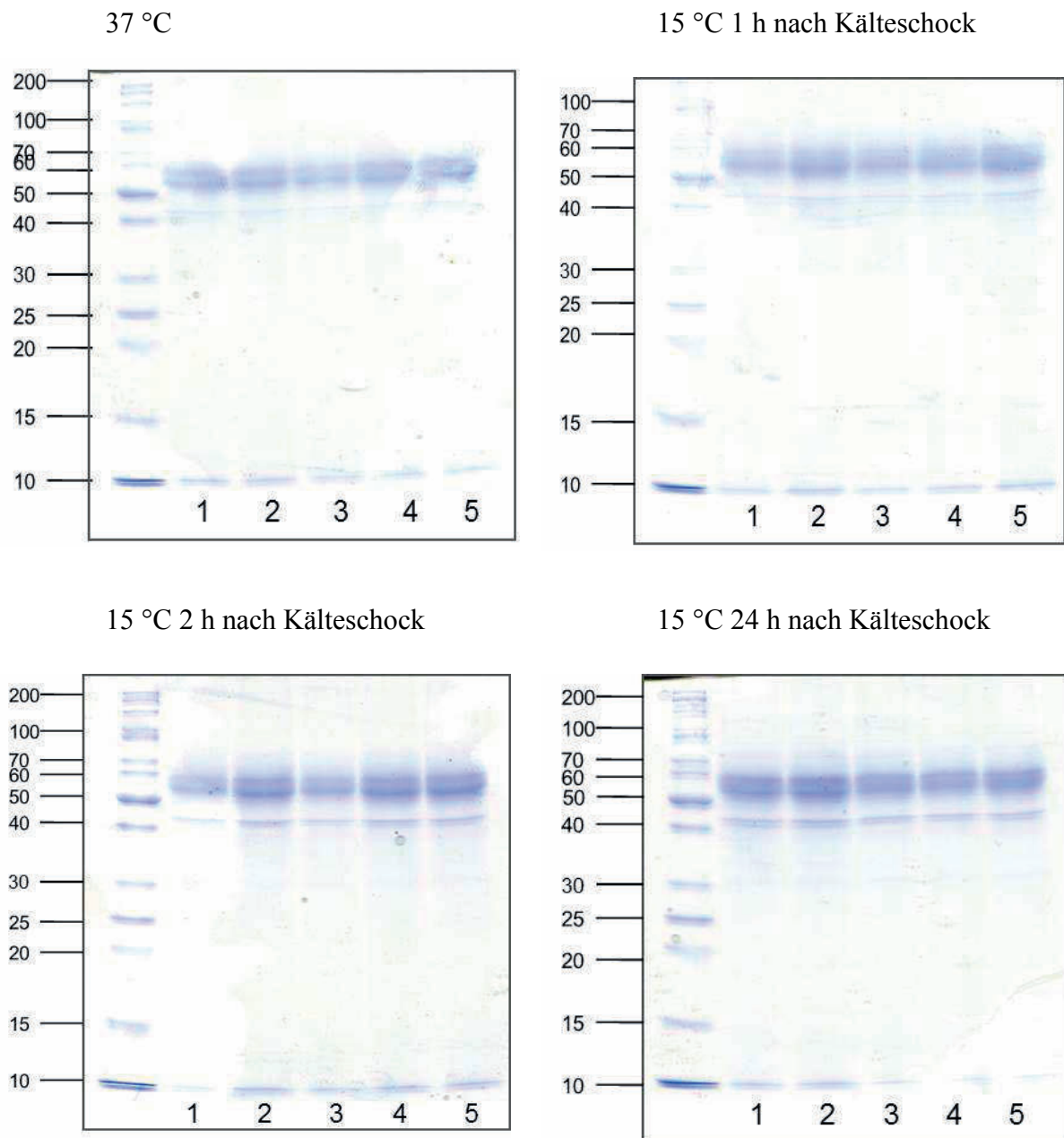
- 17) EGD-e 37°C
  - 18)  $\Delta rli47$  37°C
  - 19) EGD-e 15 °C 1 h
  - 20)  $\Delta rli47$  15 °C 1 h
  - 21) EGD-e 15 °C 2 h
  - 22)  $\Delta rli47$  15 °C 2 h
  - 23) EGD-e 15 °C 24 h
  - 24)  $\Delta rli47$  15 °C 24 h
- aufgetragene Menge Protein  
pro Spur: 5  $\mu$ g

Abb. 3.31 Zellwandproteine von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten bei 37 °C und 1 h, 2 h und 24 h nach Kälteschock.

Marker in kDa.

Die in Abb. 3.31 abgebildeten Gele zeigen die Zellwandproteine zu den unterschiedlichen Temperaturen bzw. Zeitpunkten nach Kälteschock. In allen Spuren ist das gleiche Bandenmuster zu erkennen, das heißt bei den sRNA-Deletionsmutanten ist das gleiche und damit vollständige Proteinspektrum wie beim Wildtyp EGD-e vorhanden. Daraus lässt sich schließen, dass die Deletion der sRNAs weder bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C noch nach Kälteschock einen Einfluss auf die Expression der Zellwandproteine von *L. monocytogenes* hat.

### 3.3.2 Überstandsproteine



**Abb. 3.32** Überstandsproteine von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten bei 37 °C und 1 h, 2 h und 24 h nach Kälteschock.

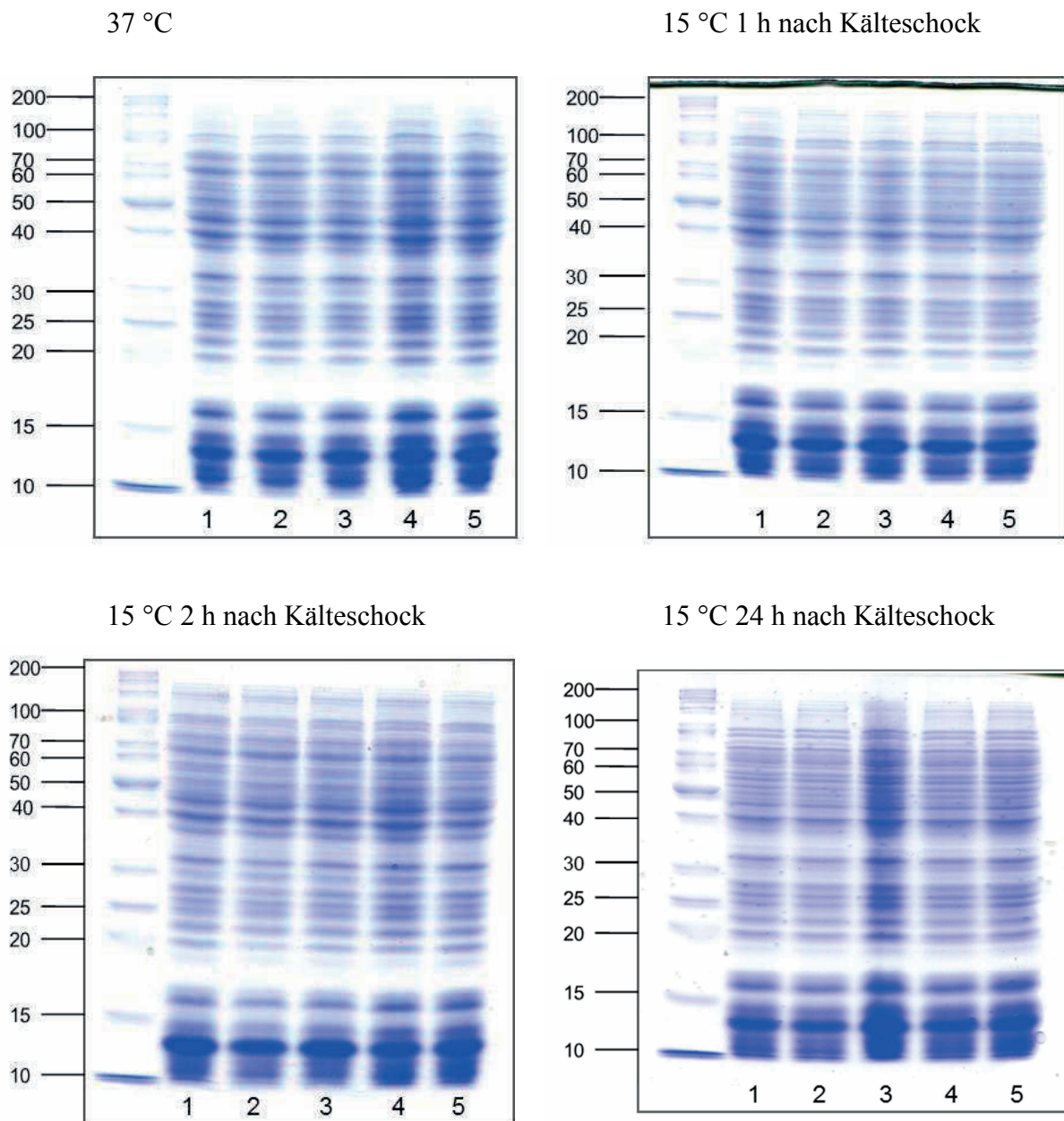
**Aufgetragene Menge Protein pro Spur: 25 µg. Marker in kDa.**

**1) EGD-e 2)  $\Delta rli78$  3)  $\Delta rli50^*$  4)  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  5)  $\Delta rli47$**

In Abb. 3.32 ist das Expressionsmuster der Überstandsproteine dargestellt. Zu sehen sind drei deutliche Banden, von denen sich eine etwas oberhalb der Markerbande 40 kDa und zwei zwischen 50 und 60 kDa befinden. Die Banden weisen in allen

Spuren und auf allen Gelen ungefähr die gleiche Stärke auf. Die Deletion der getesteten sRNAs hat keinen Einfluss auf die Expression der Überstandsproteine, weder bei 37 °C noch nach dem Kälteschock.

### 3.3.3 Zytoplasmatische Proteine



**Abb. 3.33** Zytoplasmatische Proteine von *L. monocytogenes* EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten bei 37 °C und 1 h, 2 h und 24 h nach Kälteschock.

Aufgetragene Menge Protein pro Spur: 25 µg. Marker in kDa.

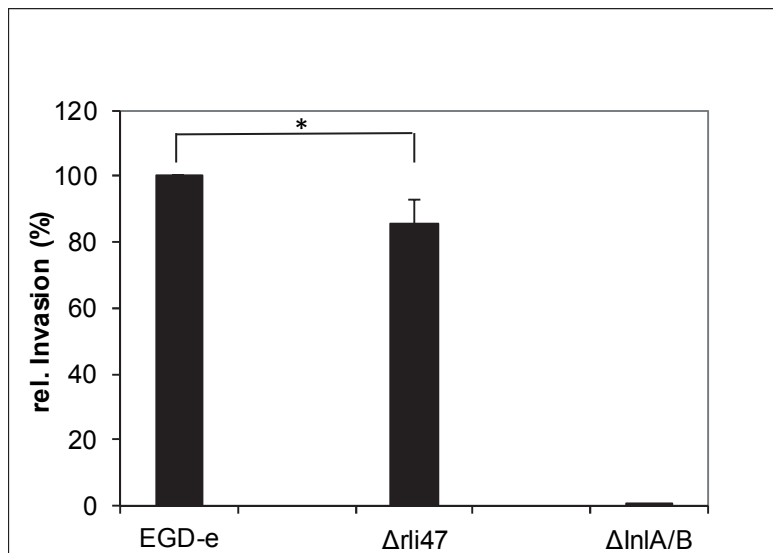
1) EGD-e 2)  $\Delta rli78$  3)  $\Delta rli50^*$  4)  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  5)  $\Delta rli47$

In Abb. 3.33 ist das Expressionsmuster der zytoplasmatischen Proteine zu sehen. Im gesamten abgebildeten Spektrum zwischen 10-200 kDA ist ein Bandenmuster zu erkennen. Vergleicht man die einzelnen Spuren von Wildtyp und Deletionsmutanten sowie die Spuren von 37 °C und den drei Zeitpunkten nach Kälteschock, so fallen keine Unterschiede hinsichtlich des Bandenmusters auf. In keiner Spur fehlen Banden oder sind zusätzliche Banden vorhanden. Besonders deutlich ausgeprägt ist in allen Spuren die Bande zwischen 10 und 15 kDA.

### 3.4 Zellkultur

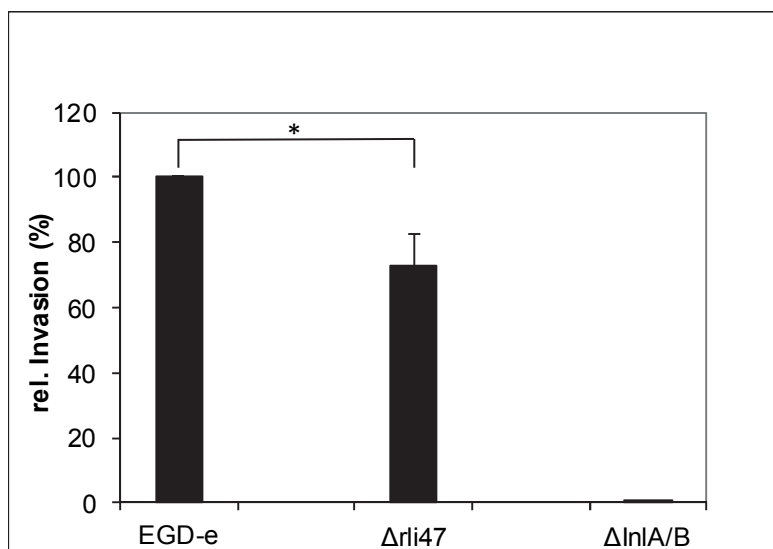
Im Infektionsversuch mit der Zelllinie Caco-2 wird das Invasionsverhalten von *L. monocytogenes* in eukaryotischen Zellen untersucht. Bei Caco-2-Zellen handelt es sich um Zellen, die aus einem humanen Dickdarmkarzinom isoliert wurden. Sie dienen als Modell für die Invasionsprozesse, die nach oraler Aufnahme von Listerien im menschlichen Dickdarm stattfinden.

Für die Zellkultur-Versuche wurde der Wildtyp EGD-e mit der sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  verglichen. Die Mutante  $\Delta rli47$  wurde ausgewählt, da sie nach Auswertung der RNA-Seq-Daten und der qRT-PCR von den getesteten sRNA-Deletionsmutanten die deutlichsten Unterschiede hinsichtlich ihrer Expression bei 37 °C und 24 h nach dem Kälteschock aufwies. Als Negativkontrolle wurde die Mutante  $\Delta InlA/B$  eingesetzt. Ohne die Internaline A und B können die Bakterien nicht in die Caco-2-Zellen eindringen. Durchgeführt wurde der Versuch zunächst mit Bakterien, die standardmäßig bei 37 °C gewachsen waren. Im zweiten Teil wurden die Zellen mit Bakterien infiziert, die zuvor dem Kälteschock von 37 auf 15 °C unterzogen und anschließend für 24 h bei 15 °C inkubiert worden waren.



**Abb. 3.34** Invasionsverhalten von *L. monocytogenes* EGD-e, *L. monocytogenes*  $\Delta rli47$  und *L. monocytogenes*  $\Delta InlA/B$  in Caco-2-Zellen bei 37 °C.

Das Invasionsverhalten der sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  ist in Relation zum Wildtyp EGD-e dargestellt. Der Vergleich der Invasionsrate von  $\Delta rli47$  mit der des Wildtyps bei einer Inkubationstemperatur der Bakterienkulturen vor Infektion von 37 °C zeigt, dass die Invasionsfähigkeit der Mutante abgeschwächt ist (Abb. 3.34). Der Unterschied ist signifikant.



**Abb. 3.35** Invasionsverhalten von *L. monocytogenes* EGD-e, *L. monocytogenes*  $\Delta rli47$  und *L. monocytogenes*  $\Delta InlA/B$  in Caco-2-Zellen 24 h nach dem Kälteschock.



Der Vergleich zwischen der Invasionsrate von EGD-e und  $\Delta rli47$  nach 24-stündiger Inkubation bei 15 °C (Abb. 3.35) zeigt ebenfalls einen Abfall der Invasionsrate durch die Deletion der sRNA *rli47*. Die Invasionsfähigkeit der Mutante ist unter diesen Bedingungen weniger stark ausgeprägt als die des Wildtyps, der Unterschied ist signifikant.

### 3.5 Infektion von *Galleria mellonella*

Neben den in-vitro-Infektionsversuchen im Zellkulturmodell mit Caco-2-Zellen kann die Pathogenität von Bakterien in-vivo getestet werden. Als Alternative zu Versuchen mit Säugetieren, in der Regel Mausversuchen, bietet sich das Insektenmodell mit Larven der Wachsmotte *Galleria mellonella* an. Einfache Haltungsbedingungen, schnelle Verfügbarkeit durch kurze Wachstumszeiten und ein höherer Durchsatz sind als Vorteile gegenüber dem Mausmodell zu nennen. Im Anschluss an die Infektion mit den Bakterien wird die Überlebenskurve über einen Zeitraum von sieben Tagen aufgezeichnet.

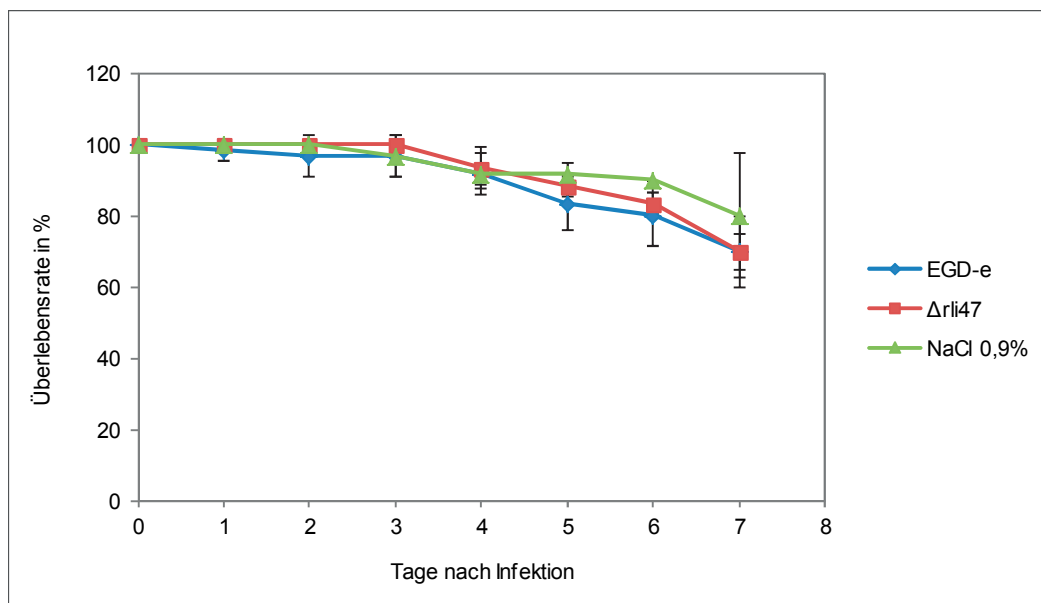


Abb. 3.36 Überlebenskurve von *Galleria mellonella* nach Infektion mit *L. monocytogenes* EGD-e und der sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  bei 37 °C.

Inokulum: EGD-e  $8,38 \cdot 10^5$  KBE/Larve;  $\Delta rli47$   $9,05 \cdot 10^5$  KBE/Larve

In Abb. 3.36 ist dargestellt, wie viele Larven der Wachsmotte *Galleria mellonella* nach Infektion mit *L. monocytogenes* EGD-e bzw.  $\Delta rli47$  nach sieben Tagen noch leben. Die Bakterienkulturen wurden in diesem Teil des Versuchs bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde den Larven 0,9%iger Kochsalzlösung injiziert. Im Idealfall sollten diese Larven nach sieben Tagen alle noch leben. In diesem Versuch sind dennoch im Durchschnitt zwei der mit Kochsalzlösung injizierten Larven gestorben. Sieben Tage nach der Infektion leben sowohl von den mit dem Wildtyp EGD-e als auch mit der sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  infizierten Larven noch sieben Stück. Die Deletion der sRNA *rli47* hat keinen Einfluss auf die Virulenz von *L. monocytogenes* in *Galleria mellonella* unter diesen Versuchsbedingungen.

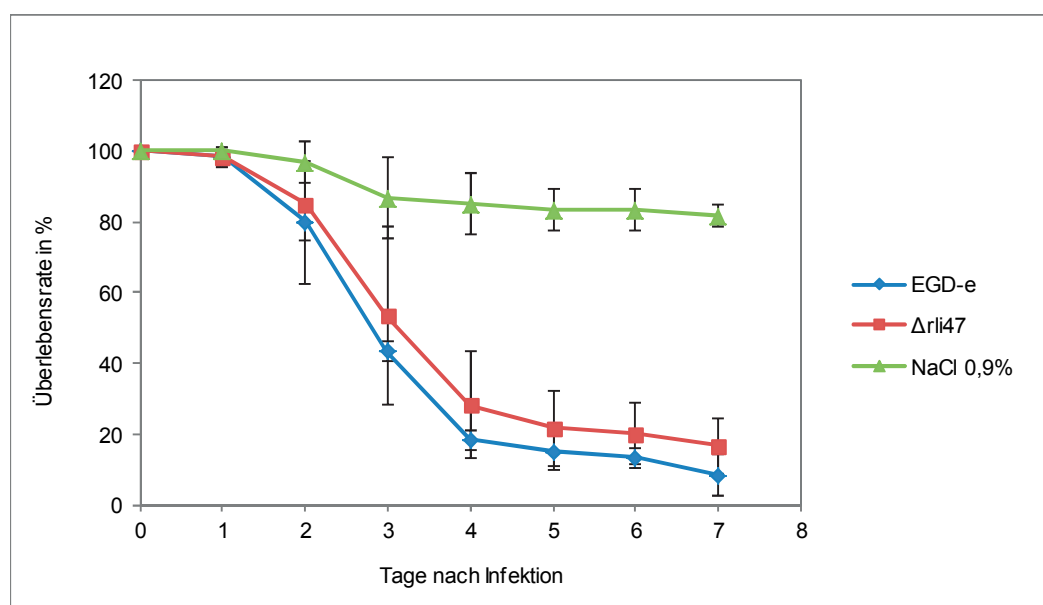


Abb. 3.37 Überlebenskurve von *Galleria mellonella* nach Infektion mit *L. monocytogenes* EGD-e und der sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  24 h nach Kälteschock.

Inokulum: EGD-e  $1,19 \cdot 10^6$  KBE/Larve;  $\Delta rli47$   $1,44 \cdot 10^6$  KBE/Larve

Werden die Larven mit Bakterien infiziert, die zuvor mit einem Kälteschock behandelt und anschließend für 24 h bei 15 °C inkubiert worden sind, ergibt sich, wie in Abb. 3.37 dargestellt, eine ganz andere Überlebenskurve als oben. Ab dem 2. Tag nach der Infektion sterben bereits die ersten Larven und die Überlebenskurve fällt in den folgenden Tagen steil ab. Es überleben nur 10 % (EGD-e) bzw. 20 % ( $\Delta rli47$ ) der Larven. Der Unterschied zwischen EGD-e und  $\Delta rli47$  ist nicht signifikant. Signifikant ist jedoch der Unterschied zwischen der Überlebenskurve der mit bei 37 °C inkubierten

Listerien infizierten Larven und der Larven, die mit den Kälte-geschockten Listerien infiziert wurden. Die Virulenz von *L. monocytogenes* im Gallerienmodell ist also deutlich erhöht, wenn die Bakterien zuvor dem Kälteschock unterzogen werden und bei 15 °C für 24 h inkubiert werden. Die Deletion der sRNA *rli47* hingegen hat – unabhängig von Kälteschock und Inkubationstemperatur – keinen Einfluss auf die Virulenz von *L. monocytogenes* bei der Infektion von *Galleria mellonella*.

## 4 Diskussion

Die Zahl identifizierter sRNAs im humanpathogenen Bakterium *L. monocytogenes* ist in den letzten Jahren rasant gestiegen. Im Fokus aktueller Untersuchungen steht nun die Frage nach deren Funktion und Bedeutung für Wachstum und Virulenz. Die Fähigkeit von *L. monocytogenes* sich auch unter Stressbedingungen, darunter Temperaturen von 0-45 °C, vermehren zu können, stellt eine Herausforderung für Lebensmittelindustrie und Medizin dar. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob sRNAs an der Reaktion von *L. monocytogenes* auf einen Kälteschock und bei Kälteadaptation beteiligt sind. Als Grundlage für die Versuche dienten zum einen die vorhandenen sRNA-Deletionsmutanten aus der institutseigenen Stammsammlung, zum anderen Transkriptionsprofile von sRNAs in *L. monocytogenes* während des Wachstums bei 37 °C sowie nach einem Kälteschock auf 15 °C und anschließendem Wachstum für 1 h, 2 h und 24 h bei 15 °C.

### 4.1 Wachstum der sRNA-Deletionsmutanten

*L. monocytogenes* ist in der Lage, sich auch bei Temperaturen weit unterhalb der für sie optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C zu vermehren. Dies ist insofern medizinisch besonders relevant, als Listerien Lebensmittelinfektionen hervorrufen und sich Kontaminationen besonders auf Lebensmitteln finden, die im Kühlschrank gelagert werden. Die Kühlung bietet also keinen sicheren Schutz vor der Vermehrung der Bakterien und dem Erreichen einer Keimzahl, die bei Konsum der kontaminierten Lebensmittel eine Listeriose hervorrufen kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sRNAs in das Wachstum von *L. monocytogenes* bei niedrigen Temperaturen und nach Kälteschock involviert sind.

Als erstes Screening und um die Zahl an sRNA-Kandidaten für weitere spezifischere und aufwändigere Versuche einzugrenzen, wurden mit den sRNA-Deletionsmutanten aus der institutseigenen Stammsammlung Wachstumsversuche unter verschiedenen (Stress-) Bedingungen durchgeführt. Je nach Versuchsaufbau und -komplexität wurden entweder alle vorhandenen sRNA-Deletionsmutanten untersucht oder anhand der RNA-Seq-Daten eine Vorauswahl getroffen.

Wachstumskurven bieten die Möglichkeit, das Wachstum von Bakterien über einen Zeitverlauf zu beobachten und verschiedene Stämme zu vergleichen. Sie geben einen Überblick über Wachstumsgeschwindigkeit und das Erreichen der verschiedenen Wachstumsphasen. Gemessen wird die Lichtabsorption als optische Dichte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. In dieser Arbeit wurden alle Wachstumskurven in Kolben durchgeführt. Eine Alternative dazu bietet ein Messautomat (z.B. Tecan Infinite® 200). Dieser hat den Vorteil, dass die Inkubation der Bakterienkulturen zur Messung der optischen Dichte nicht unterbrochen werden muss und die Wachstumsbedingungen so über den gesamten Verlauf konstant bleiben. Außerdem sind häufigere Messungen mit kürzeren Abständen möglich. Da dieses Gerät jedoch nur für Temperaturen bis Raumtemperatur zugelassen ist, kam es für einen Großteil der Versuche nicht in Frage. Aus diesem Grund wurden alle Wachstumskurven in dieser Arbeit einheitlich in Kolben durchgeführt. Neben der für den Kälteschock gewählten Temperatur von 15 °C wurden einige Versuche auch bei 4 °C durchgeführt. Grund dafür war die Annahme, dass sich Veränderungen im Wachstumsverhalten umso extremer darstellen, je niedriger die Temperatur ist bzw. mögliche Unterschiede überhaupt erst bei der niedrigeren Temperatur erkennbar werden.

Die Wachstumskurven haben gezeigt, dass eine Deletion der untersuchten sRNAs keinen Einfluss auf das Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen (4 °C, 15 °C, 24 h nach Kälteschock) hat. Auch der Zusatz von Ethanol oder Wasserstoffperoxid führt zu keinen Unterschieden im Wachstumsverhalten bei Kälte zwischen Wildtyp und Mutanten. Die sRNAs werden demnach unter den angewandten Testbedingungen nicht benötigt, um die Zelle vor Kältestress, oxidativem Stress oder Zellschäden durch Alkohol zu schützen. Die Versuche zum Wachstum auf festem Medium (BHI-Agarplatten) bestätigen diesen Eindruck. Auch hier zeigten sich weder bei einer Inkubationstemperatur von 4 noch bei 15 °C Unterschiede im Vergleich von Wildtyp und sRNA-Deletionsmutanten.

Das Ausplattieren zum Zeitpunkt 2 h nach dem Kälteschock hat ergeben, dass insbesondere die Mutante  $\Delta rli78$  besser gewachsen ist als der Wildtyp. Daraus lässt sich schließen, dass die sRNA *rli78* für das Wachstum nach Kälteschock nicht benötigt wird. Im Gegenteil scheinen durch die Deletion regulative Mechanismen wegzufallen, die das Wachstum sonst hemmen. Diese Vermutung ließe sich durch Experimente mit einer Überexpression weiter untersuchen. Es wäre zu erwarten, dass das Wachstum in diesem

Fall hinter dem des Wildtyps zurück bleibt. Durch das Ausplattieren und Zählen der Kolonie-bildenden Einheiten erhält man ein exakteres Ergebnis als mit der Messung der optischen Dichte in Wachstumskurven. Wahrscheinlich sind deshalb in diesem Versuch feinere Unterschiede zu erkennen, die in den Wachstumskurven nicht sichtbar werden.

Auf Weichagarplatten wird der Einfluss der sRNAs auf das Schwärmverhalten und damit die Motilität von *L. monocytogenes* untersucht. Die ausgewählten sRNAs zeigten bei 37 °C keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp, sie scheinen also für die Beweglichkeit auf Weichagar bei dieser Temperatur nicht essentiell zu sein. Bei 15 °C blieb als einzige die Mutante  $\Delta rli107$  signifikant hinter dem Wildtyp zurück, bei 4 °C sind die Deletionsmutanten  $\Delta rli81$  und  $\Delta rli50^*$  weniger beweglich. Die sRNA *rli107* liegt zwischen den Genen *lmo2555* und *lmo2556*. Das Gen *lmo2555* ist in den Glykolipidstoffwechsel von *L. monocytogenes* involviert; es kodiert für ein Enzym der Glykolipidsynthese (Webb et al., 2009). Es bleibt zu klären, über welche Wege eine Regulation der Motilität durch *rli107* stattfindet. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass, abgesehen von den drei oben genannten, die getesteten sRNAs nicht oder zumindest nicht in dem Ausmaß in die Flagellinsynthese eingreifen, dass es in einer veränderten Beweglichkeit sichtbar wird. Auch wenn *rli81*, *rli50\** und *rli107* zu einer signifikanten Einschränkung der Beweglichkeit bei 4 bzw. 15 °C führen, so ist diese verglichen mit den Auswirkungen einer Deletion von *flaA* doch relativ gering und scheint eher feinregulatorisch zu sein.

Ein neues Konzept der Genregulation ist das Excludon, das auch im Zusammenhang mit der Flagellinsynthese steht (Sesto et al., 2013). Es beschreibt sehr lange asRNAs, die sich über zwei oder mehrere Gene oder Operons in verschiedene Richtungen erstrecken. Sie können die Genexpression eines Operons inhibieren und gleichzeitig als mRNA für ein anderes Operon fungieren. So reguliert die antisense RNA anti0677 die Flagellinsynthese und agiert als mRNA für MogR. MogR wiederum ist ein negativer Regulator von Flagellin (Gründling et al., 2004).

Dass sRNAs die Beweglichkeit durch direkte Regulation der Flagellinsynthese beeinflussen, konnte in *E. coli* erstmals für McaS gezeigt werden. Die sRNA erhöht die Motilität durch Aktivierung von *flhD*, dem Master-Regulator der Flagellinsynthese (Thomason et al., 2012). Vier weitere sRNAs (*ArcZ*, *OmrA*, *OmrB* und *OxyS*) führen

durch negative Regulation der Master-Regulatoren *flhD* und *flhC* zu einer Verminderung der Beweglichkeit (Lay und Gottesman, 2012).

## 4.2 RNA-Analyse

Die Ergebnisse der RNA-Seq-Daten wurden ausgewertet, um einen Überblick über das gesamte Transkriptionsprofil der sRNAs in *L. monocytogenes* bei 37 °C und 1 h, 2 h sowie 24 h nach dem Kälteschock auf 15 °C zu erhalten und eine Auswahl für weitergehende Untersuchungen treffen zu können. Die Herangehensweise beruhte auf der Idee, zum einen möglichst stark regulierte sRNA-Kandidaten herauszufiltern, zum anderen eine Auswahl zu treffen, die unterschiedliche Expressionsmuster abbildet. Außerdem wurden die Haushalts-sRNAs *ssrA*, *ssrS* und *rnpB* in die Auswahl einbezogen. Die Gründe, warum die jeweiligen sRNAs ausgewählt wurden, werden weiter unten im Einzelnen erläutert. Der jeweilige sRNA-Lokus und die flankierenden Gene sind im Anhang dargestellt.

Zur Analyse der RNA von *L. monocytogenes* wurden in dieser Arbeit RT-PCR mit anschließender Messung der Bandendichte auf dem Gelbild und qRT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Daten aus der RNA-Seq-Analyse verglichen und sollten diese bestätigen oder ggfs. widerlegen. Anhand der Ergebnisse von RT- und qRT-PCR lassen sich die sRNA-Kandidaten je nach Expressionsmuster in Gruppen zusammenfassen. Alle sRNAs ausgenommen *rli47* haben die Gemeinsamkeit, dass bei der Kälteadaptation 24 h nach Kälteschock die niedrigste Kopienzahl vorliegt. Die beiden sRNAs *rli78* und *rli44* lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: beide haben das höchste Expressionslevel beim Wachstum bei 37 °C, während die Kopienzahl nach Kälteschock kontinuierlich abfällt. FMN passt von der Tendenz her dazu, nach Kälteschock weniger exprimiert zu werden als bei 37 °C. Hier gilt allerdings die Einschränkung, dass die Expression 2 h nach Kälteschock höher ist als nach 1 h. *ssrA*, *ssrS* und *rnpB* bilden insofern eine Gruppe, als sie im Vergleich zu 37 °C höhere Expressionslevel zum Zeitpunkt 1 h nach Kälteschock (*ssrA*) bzw. 1 und 2 h nach Kälteschock (*ssrS*, *rnpB*) aufweisen.

Insgesamt zeigt der Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR mit den RNA-Seq-Daten einige Diskrepanzen und Widersprüchlichkeiten. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse der qRT-PCR auf drei biologischen Versuchen beruhen und damit

als valider gelten können als die RNA-Seq-Daten, die nur die Ergebnisse eines biologischen Versuches repräsentieren.

Im Zuge weitergehender Auswertungen wurden Target-Analysen durchgeführt mit dem Ziel, Vorhersagen über putative Zielstrukturen auf mRNA-Ebene machen zu können. Daraus können Erkenntnisse über mögliche Funktionen der ausgewählten sRNAs gewonnen werden. Für diese Analysen wurden die Programme TargetRNA2 (Kery et al., 2014) und RNAPredator (Eggenhofer et al., 2011) eingesetzt. Sie wurden mit den Sequenzen der jeweiligen sRNAs wie von Mraheil et al. (Mraheil et al., 2011) und von Wurtzel et al. (Wurtzel et al., 2012) publiziert durchgeführt (siehe Anhang).

#### 4.2.1 *rli44*

Die sRNA *rli44* liegt zwischen den Genen *lmo1964* und *lmo1965*. *lmo1964* kodiert für ein ABC-Transporter ATP-bindendes Protein, *lmo1965* für ein hypothetisches Protein.

Die RNA-Seq-Daten für *rli44* zeigen, dass die Expression zum Zeitpunkt 1 h und besonders 2 h nach Kälteschock stark erhöht ist. Im Detail liegt eine Erhöhung der Sequenzanzahl im Vergleich von 37 °C zu 1 h nach Kälteschock um den Faktor 2,4 und im Vergleich von 37 °C zu 2 h nach Kälteschock um den Faktor 6,9 vor. Diese hohe relative Expressionsänderung 2 h nach dem Kälteschock hob sich von den meisten übrigen analysierten sRNAs deutlich ab, weshalb *rli44* in die weitere RNA-Analyse mit RT-PCR und qRT-PCR eingeschlossen wurde. Bei der Kälteadaptation 24 h nach Kälteschock ist das Expressionslevel dann wieder niedriger und liegt unterhalb dem bei 37 °C. Die qRT-PCR konnte die Ergebnisse von RNA-Seq nicht bestätigen. qRT-PCR und die Gelbandenanalyse nach RT-PCR liefern jedoch ein einheitliches Bild. Hier ist die Kopienzahl bzw. die Stärke der Banden bei 37 °C mit Abstand am höchsten bzw. stärksten und fällt 1 h nach Kälteschock deutlich ab, zum Zeitpunkt 2 h nach Kälteschock kommt es zu einem weiteren Abfall, während 24 h nach Kälteschock am wenigsten RNA vorliegt.

Toledo-Arana et al. haben die Expression von *rli44* bei 30 °C untersucht und festgestellt, dass diese im Vergleich zu 37 °C dreifach hochreguliert ist (Toledo-Arana et al., 2009). Ein Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit ist nur eingeschränkt möglich, da sich die Versuchsbedingungen, insbesondere in Hinblick auf die Temperaturen, die als Kälte definiert wurden (30 °C vs. 15 °C), unterscheiden. Während



die Daten aus RNA-Seq und von Toledo-Arana et al. nahelegen, dass *rli44* zum Überleben oder Wachstum bei Kälte bzw. nach dem Kälteschock benötigt wird, suggerieren die Ergebnisse der qRT-PCR im Gegenteil, dass die sRNA keine Rolle spielt und die Expression deshalb nach dem abrupten Temperaturabfall herunterreguliert wird. Eine eindeutige bzw. einheitliche Aussage lässt sich anhand der vorliegenden Daten also nicht treffen. Um genauere Erkenntnisse über die Bedeutung von *rli44* zu gewinnen, wären die Herstellung einer isogenischen Deletionsmutante und phänotypische Untersuchungen notwendig. Weiterhin ergab eine Analyse eine Interaktion zwischen *rli44* und *rli46* (Toledo-Arana et al., 2009). Daraus ergeben sich neue Ansätze für weitere Experimente, die z. B. die Auswirkungen einer Deletion dieser sRNAs in einer Doppelmutante untersuchen und Aufschlüsse über regulatorische Netzwerke von sRNAs geben könnten.

Die Target-Analyse mit TargetRNA2 liefert als bestes Ergebnis (Energie = -20,75 kcal/mol; p-Value = 0,000) *lmo1320*, das für PolC, die DNA-Polymerase III, kodiert. Die Analyse mit RNAPredator ergibt als bestes (Sequenz nach Wurtzel et al., 2012) bzw. zweitbestes Ergebnis (Sequenz nach Mraheil et al., 2011) das Gen *lmo1922*, das für die  $\beta$ -Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase kodiert. Diese ist in den Fettsäurestoffwechsel involviert und katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt in der Fettsäuresynthese. Eine mögliche Interaktion zwischen der sRNA *rli44* und *lmo1922* könnte Auswirkungen auf die Fettsäuresynthese und damit auf die Membranfluidität haben. Veränderungen in der Membranfluidität sind ein wichtiger Anpassungsmechanismus von Bakterien nach Kälteexposition, so dass hier regulative Eingriffe in den Kältestoffwechsel von *L. monocytogenes* durch die sRNA denkbar sind. Neben dem Wachstum bei niedrigen Temperaturen sind anteiso-verzweigtkettige Fettsäuren an der Resistenz von *L. monocytogenes* gegenüber Phagosomen in Makrophagen involviert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sie an der Virulenz beteiligt sind, indem sie die Produktion des Virulenzfaktors Listeriolysin O beeinflussen (Sun et al., 2012).

#### 4.2.2 *rli47*

Die sRNA *rli47* wurde ausgewählt, weil sie in den RNA-Seq-Daten einen Wert zeigte, der aus den Ergebnissen aller anderen untersuchten sRNAs herausstach: Bei der Kälteadaptation 24 h nach Kälteschock war die Sequenzanzahl im Vergleich zu 37 °C

fast um den Faktor 2000 erhöht. Dieser Wert war mit deutlichem Abstand der höchste in der gesamten RNA-Seq Analyse. Dies konnte auch mit RT-PCR gezeigt werden, wo eine deutlich stärkere Bande vorhanden war. Ebenso bestätigte die qRT-PCR das Vorliegen einer höheren Kopienzahl bei permanentem Kältewachstum als bei 37 °C und 1 bzw. 2 h nach Kälteschock. Ein solches Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die sRNA in *L. monocytogenes* beim Kältewachstum und –überleben, insbesondere bei der Kälteadaptation, benötigt oder an der Virulenz beteiligt sein könnte.

Flankiert wird *rli47* von *lmo2141* und *lmo2142*, die beide für hypothetische Proteine kodieren. Die Target-Analyse mittels TargetRNA2 liefert für *rli47* an erster Position (Energie -17,44 kcal/mol, p-Value 0,000) *ilvA*, Synonym *lmo1991*, das für die Threonin-Dehydratase kodiert. Eine Metabolom-Analyse der Kälteakklimatisation des arktischen Mesorhizobium sp. Strain N33 ergab, dass Threonin neben anderen wasserlöslichen Metaboliten beim Wachstum bei 4 °C akkumuliert (Ghobakhlou et al., 2013). Darauf, dass die Threonin-Dehydratase eine Funktion bei der Anpassung von Bakterien an niedrige Temperaturen oder nach einem Kälteschock hat, finden sich in der Literatur keine Hinweise. Welche Auswirkungen eine mögliche Interaktion von *rli47* mit *ilvA* haben könnte, bleibt daher unklar.

Zur Diskussion der Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen der Mutante  $\Delta rli47$  siehe Kapitel 4.4.

#### 4.2.3 *rli78*

Die sRNA *rli78* lässt sich im Hinblick auf das Expressionsmuster nach Kälteschock als „Gegenspieler“ zu *rli47* bezeichnen. Sie liegt zwischen *lmo0470* und *lmo0471*, die beide für hypothetische Proteine kodieren. *rli78* weist 94% Homologie zu *rli112* auf. Der chromosomale Locus *lmo0459-lmo0479*, in dem *rli78* liegt, zeigt einen niedrigen GC-Gehalt, weshalb hier horizontaler Gentransfer vermutet wurde (Mraheil et al., 2011).

Die sRNA *rli78* wurde für weitere Analysen ausgewählt, weil bei ihr ein deutlicher Unterschied in der Regulation zu sehen war: Diese sRNA wird bei 37 °C sehr stark exprimiert, während das Expressionslevel 24 h nach dem Kälteschock sehr niedrig ist. Die sRNA hat beim Wachstum bei 37 °C die höchsten Sequenzanzahl in der RNA-Seq Analyse, dies deckt sich mit der höchsten Kopienzahl in der qRT-PCR und der stärksten

Bande auf dem Gelbild nach RT-PCR. Einheitlich ist auch der niedrigste Wert zum Zeitpunkt 24 h nach Kälteschock. In dem Bereich dazwischen, dem Kälteschock, gibt es Abweichungen: während RT- und qRT-PCR einen kontinuierlichen Abfall der Kopienzahl von 37 °C über 1 h und 2 h bis hin zu 24 h zeigen, ist in RNA-Seq die Sequenzanzahl 2 h nach Kälteschock höher als nach 1 h. In den Untersuchungen von Toledo-Arana et al. ist die sRNA *rli78* nicht enthalten (Toledo-Arana et al., 2009). Aus den vorliegenden Daten lässt sich einheitlich schließen, dass *rli78* bei der Kälteadaptation keine Rolle zu spielen scheint und die Genexpression deshalb stark zurückgefahren wird. Auch liegt die Schlussfolgerung nahe, dass *rli78* nach dem Kälteschock zum Wachstum nicht in dem Ausmaß benötigt wird wie beim Wachstum bei 37 °C und deshalb weniger exprimiert wird. Welche regulativen Mechanismen dahinterstecken bleibt unklar. Eine Annäherung bietet die Suche nach putativen Zielstrukturen.

Die Target-Suche mit TargetRNA2 liefert an erster Stelle *frr* bzw. *lmo1314*. *Frr* kodiert für den Ribosomen-Recyclingfaktor RRF. Das Zielgen *lmo1314* findet sich auch in der Target-Analyse mit RNAPredator an zweiter Stelle. Nach Abschluss der Proteinbiosynthese „recycelt“ RRF die Ribosomen, indem er sie von der mRNA trennt und so erneut verfügbar macht. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass RRF für das bakterielle Wachstum unabdingbar ist (Janosi et al., 1994). Laut Weber et al. ist *frr* in *B. subtilis* nach dem Kälteschock reprimiert (Weber und Marahiel, 2003). Dies widerspricht sich jedoch mit den Angaben in der Referenzquelle. Hier gibt es eine Aussage zu *rbfA*: demnach wird *rbfA*, das für den Ribosomen-Bindungsfaktor kodiert, nach Kälteschock von 37 auf 15 °C zweifach höher exprimiert (Beckering et al., 2002). Da die Literaturangaben an dieser Stelle widersprüchlich sind und sich nicht weiter verifizieren ließen, können keine Aussagen über eine mögliche Interaktion zwischen *rli78* und *frr* in *L. monocytogenes* und deren Auswirkungen auf den Stoffwechsel getroffen werden. Weitere Versuche mit einer Überexpression von *rli78* könnten Hinweise darauf geben, ob dadurch Auswirkungen auf Wachstum oder Virulenz sichtbar werden.

#### 4.2.4 FMN

FMN wurde wegen seiner Rolle als Riboswitch in die Analyse einbezogen. Die Ergebnisse von RT-PCR, qRT-PCR und RNA-Seq ergeben für FMN kein einheitliches

Ergebnis. Der einzige Punkt, der in allen drei Analysen übereinstimmt, ist die niedrigste Expression zum Zeitpunkt 24 h nach Kälteschock.

Riboswitches sind interessante Zielstrukturen für neue antibiotische Therapien. FMN ist ein Beispiel dafür, wie durch Ligandenbindung das Wachstum direkt beeinflusst werden kann. Roseoflavin, ein Analogon des natürlichen FMN-Liganden Riboflavin, bindet den FMN-Riboswitch und führt darüber zu einer Hemmung des bakteriellen Wachstums und der Expression des stromabwärts gelegenen Gens *lmo1945*. Gleichzeitig wird aber auch eine vermehrte Expression der Virulenzgene *plcA*, *hly* und *actA* beobachtet (Mansjö und Johansson, 2011).

#### 4.2.5 Haushalts-sRNAs *ssrA*, *ssrS* und *rnpB*

Die Haushalts-sRNA *ssrA* (small stable RNA A) wird auch als tmRNA oder 10Sa RNA bezeichnet. Sie kodiert für tmRNA, die gleichzeitig zwei Eigenschaften als tRNA und mRNA innehat. Sowohl die qRT-PCR als auch die RNA-Seq-Daten zeigen, dass das Expressionslevel von *ssrA* 1 h nach Kälteschock am höchsten ist. Auch in der Gelanalyse nach RT-PCR ist die Bande zu diesem Zeitpunkt am stärksten. Die Rolle von *ssrA* in verschiedenen Stresssituationen, insbesondere nach Temperaturstress, wurde u. a. für *B. subtilis* untersucht. In *B. subtilis* ist *ssrA* Teil eines Gen-Clusters mit den fünf Genen *secG-yvaK-rnr-smpB-ssrA*. Aus einer Studie von Muto et al. ist bekannt, dass *ssrA* für das Wachstum bei hohen Temperaturen benötigt wird (Muto et al., 2000). Shin et al. konnten dies 2007 bestätigen. Sie stellten die isogenische Deletionsmutante  $\Delta ssrA$  her, die nach einem Hitzeschock von 37 auf 52 °C signifikant schlechteres Wachstum zeigte. Darüber hinaus untersuchte die Gruppe auch den Einfluss von Kälteschock, hier definiert als abrupter Abfall der Wachstumstemperatur von 37 auf 16 °C. Es stellte sich heraus, dass dies ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der *ssrA*-Deletionsmutante hatte. Die Mutante zeigte einen Phänotyp mit stark eingeschränktem Wachstum nach der Temperaturänderung (Shin und Price, 2007). Eine weitere Arbeitsgruppe um Cairrão hat untersucht, ob die RNase R eine Rolle bei der Reifung von *ssrA*/tmRNA unter Kälteschockbedingungen spielt. Die Expression von *rnr* wird bei Kälteschock von 37 auf 10 °C induziert. Northern Blot-Analysen zeigten, dass sich die Halbwertszeit der Vorläuferform von *ssrA*/tmRNA unter Kälteschockbedingungen in der *rnr*-Mutante stabilisierte. Es konnte ein dreifacher Anstieg der Vorläuferform im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Cairrão et

al., 2003). Die Ergebnisse der RNA-Analyse aus dieser Arbeit und die zitierten Studien weisen auf die Bedeutung von *ssrA* nach dem Kälteschock hin. Ob eine Deletion dieser sRNA in *L. monocytogenes* analog zu *B. subtilis* einen phänotypischen Effekt bei Wachstum nach Kälteschock hat, muss in weiterführenden Untersuchungen z. B. mit einer Deletionsmutante geklärt werden.

*ssrS*, auch als 6S RNA bezeichnet, ist eine der ersten entdeckten sRNAs in Bakterien. Die Gelanalyse der Banden nach RT-PCR unterscheidet sich von den Ergebnissen der qRT-PCR und RNA-Seq. Hier ist die Bande bei 37 °C am stärksten und fällt 1 h nach Kälteschock schwächer aus. Die Banden 2 h und 24 h nach Kälteschock sind ungefähr gleich stark, aber wiederum schwächer als die nach 1 h. In der Literatur finden sich keine Hinweise auf eine Beteiligung von *ssrS* an der Kältereulation von Bakterien.

Sowohl für *ssrA* als auch für *ssrS* findet sich in der Target-Analyse mit TargetRNA2 (für *ssrA* mit der Sequenz von Wurtzel) *lmo0685* an erster Stelle. Dieses Gen kodiert für das Flagellar-Motorprotein MotA. Mattila et al. haben die Rolle von MotA in *L. monocytogenes* beim Wachstum bei 25 und 3 °C untersucht. Interessant sind vor allem die Ergebnisse ihrer Untersuchungen bei 3 °C. *motA* zeigte in der qRT-PCR im Vergleich zu 37 °C signifikant höhere Expressionslevel. Weiterhin wurden Wachstumsanalysen mit einer *motA*-Deletionsmutante durchgeführt, die bei 3 °C eingeschränktes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigte. Die Deletion von *motA* hat außerdem Einfluss auf die Beweglichkeit; untersucht wurden die Beweglichkeit mit Phasenkontrastmikroskopie sowie das Schwärmverhalten auf Weichagar. Die Mutante zeigte sich bei allen untersuchten Temperaturen (3, 25 und 37 °C) im Gegensatz zum Wildtyp (beweglich bei 3 und 25 °C) unbeweglich (Mattila et al., 2011). Eine Interaktion zwischen *ssrA* bzw. *ssrS* und *lmo0685* könnte sich auf Wachstum und Beweglichkeit von *L. monocytogenes* bei niedrigen Temperaturen auswirken. Wachstumsversuche bei Kälte oder nach dem Kälteschock sowie Untersuchungen der Beweglichkeit und des Schwärmverhalten auf Weichagar mit *ssrA*- und *ssrS*-Deletionsmutanten könnten Aufschluss über eine hemmende oder aktivierende Wirkung einer möglichen Bindung der beiden sRNAs an *lmo0685* geben.

Für die Haushalts-sRNA *rnpB* (RNase P RNA) decken sich die Ergebnisse der Gelanalyse nach RT-PCR mit den RNA-Seq-Daten, während die qRT-PCR abweichende und teilweise sogar gegensätzliche Ergebnisse zeigt. Besonders gravierend

ist der Zeitpunkt 24 h nach Kälteschock. Die Bande auf dem Agarosegel ist hier am stärksten, während die Banden zu den anderen drei Zeitpunkten untereinander ähnlich stark sind. Auch in der RNA-Seq Analyse findet sich die höchste Sequenzanzahl mit Abstand 24 h nach Kälteschock. Erstaunlicherweise liefert die qRT-PCR für den Zeitpunkt 24 h nach Kälteschock die niedrigste Kopienzahl. Am höchsten exprimiert ist *rnpB* hiernach 1 h nach Kälteschock. Wie es zu diesen extrem unterschiedlichen Ergebnissen kommt, lässt sich nicht erklären. Zur Beteiligung von *rnpB* an der Kältereulation von *L. monocytogenes* oder auch anderen Bakterien konnten keine Studien gefunden werden. Eine mögliche Zielstruktur ist *dnaE*, das für die  $\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III kodiert. *dnaE* wird in der Literatur zusammen mit *polC*, einem möglichen Target von *rli44*, erwähnt. Eine Verbindung zu Kälte findet sich jedoch auch hier nicht.

### 4.3 Proteinanalytik

Ziel der Untersuchungen zur Proteinexpression war es herauszufinden, ob sich die Deletion einzelner sRNAs auf die Synthese von Proteinen in *L. monocytogenes* nach einem Kälteschock und nach Kälteadaptation auswirkt.

Für die Proteinanalytik wurden vier sRNA-Deletionsmutanten ausgewählt: *L. monocytogenes*  $\Delta rli78$ ,  $\Delta rli50^*$ ,  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  und  $\Delta rli47$ . Mit den beiden Deletionsmutanten  $\Delta rli78$  und  $\Delta rli47$  wurden zwei Kandidaten ausgewählt, die sich, wie oben beschrieben, durch gegensätzliche Regulation der Expression nach Kälteschock auszeichnen. Die Mutante  $\Delta rli50^*$  ist intrazellulär hochreguliert und wurde bereits phänotypisch im Insekten- und im Mausmodell untersucht (Mraheil et al., 2011). Die sRNA *rli50* liegt zwischen *lmo2709* und *lmo2710* auf dem Minusstrang und überlappt mit *rli112* auf dem Plusstrang zu ca. 43%. Aus diesem Grund wurde neben *rli50* auch das distale Ende von *rli112* deletiert und die Mutante deshalb als  $\Delta rli50^*$  bezeichnet. Die Doppelmutante  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  enthält die Deletion von *rli50* und Teilen von *rli112* sowie die Deletion von *rli78*, die wiederum 94% Homologie zu *rli112* aufweist. Diese beiden Mutanten ergänzen das Bild um die Mutante  $\Delta rli78$  und runden es ab, wodurch sich die Auswahl dieser Kandidaten für die Proteinanalytik begründet.

Wie in den zuvor beschriebenen Versuchen wurden drei verschiedene Zeitpunkte nach dem Kälteschock untersucht und mit dem Proteinexpressionsmuster der jeweiligen Mutante nach Wachstum bei 37 °C sowie dem Wildtyp EGD-e als Referenz verglichen.

Betrachtet man die Expression der Zellwandproteine, fallen keine Unterschiede hinsichtlich Anzahl und Verteilung der Banden auf. Zu allen Zeitpunkten werden also von den untersuchten Kandidaten die gleichen Proteine exprimiert. Des Weiteren unterscheiden sich die sRNA-Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer Proteinexpression nicht vom Wildtyp. Das gleiche gilt auch für die Überstandsproteine und die zytoplasmatischen Proteine.

Die Analyse dieser drei Fraktionen deckt das gesamte Spektrum der intra- und extrazellulären Proteinexpression von Prokaryonten ab. Es lässt sich also feststellen, dass ein Kälteschock von 37 auf 15 °C und ein anschließendes Wachstum bei 15 °C für 1 h, 2 h oder 24 h mit der angewandten Methode keinen nachweisbaren Einfluss auf die Proteinexpression der vier ausgewählten sRNA-Deletionsmutanten hat. Daraus lassen sich verschiedene Vermutungen ableiten. Möglich wäre es, dass diese sRNAs nicht an der Regulation der Proteinsynthese bei Kälte beteiligt sind. Um eine umfassendere, generalisierte Aussage darüber machen zu können, müssten weitere sRNA-Deletionsmutanten auf ihr Proteinexpressionsmuster bei Kälte untersucht werden. Dies ist mit der hier angewandten Methode im Rahmen einer Dissertation für die Anzahl bisher bekannter sRNAs nicht möglich. Es könnte auch sein, dass bestimmte sRNAs zwar an der Proteinsynthese regulatorisch beteiligt sind, ihr Einfluss jedoch so gering ist, dass er im Coomassie-gefärbten zweidimensionalen Gel nicht sichtbar wird. Eine Möglichkeit für eine exaktere Analyse bieten dreidimensionale Gele. Denkbar ist ebenfalls, dass zwei oder mehrere sRNAs synergistisch wirken und nur in Kombination einen sichtbaren Effekt haben. Auswirkungen auf die Proteinsynthese und damit das Bandenmuster würden sich dann erst zeigen, wenn diese sRNAs gleichzeitig deletiert werden, wie es für die Mutante  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  bereits gemacht wurde.

Folgende Beispiele zeigen, dass eine Regulation von Proteinen durch bestimmte sRNAs in *L. monocytogenes* bekannt ist; diese steht jedoch in keinem Zusammenhang mit Kälte. So ergab eine funktionelle Analyse der sRNA *rli27*, dass sie die Expression des Zellwandproteins Imo0514 während der Infektion von eukaryotischen Zellen reguliert (Quereda et al., 2014). Eine weitere sRNA, LhrA, beeinflusst, vermittelt durch das Chaperon Hfq, die Expression der Chitinase ChiA (Nielsen et al., 2011).

#### 4.4 Die sRNA *rli47* und weitere SigB-abhängige sRNAs

Der sRNA *rli47* kommt in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zu. Die Ergebnisse der RNA-Analyse der sRNA *rli47* wurden in Kapitel 4.2.2 diskutiert. Die starke Regulation nach 24-stündigem Wachstum bei 15 °C war gegenüber allen anderen sequenzierten sRNAs herausragend. Deswegen wurde diese sRNA ausgewählt, um sie neben den Wachstumsversuchen und der Proteinanalytik auch in Infektionsversuchen zu testen. Da zum Zeitpunkt des unmittelbaren Kälteschocks, also 1 bzw. 2 h nach dem Temperaturabfall von 37 auf 15 °C, die Regulation der Expression nicht so stark betroffen ist, wurde der Fokus der Untersuchungen für *rli47* auf die Kälteadaptation nach 24 h gelegt. Diese sRNA war aufgrund der starken Hochregulation der aussichtsreichste Kandidat für einen Phänotyp. In den vorangegangenen Versuchen zum Wachstumsverhalten und zur Proteinexpression hat sich diese Erwartung jedoch nicht bestätigt. Unter den getesteten Konditionen hat die Deletion von *rli47* keine phänotypischen Eigenschaften der Mutante hervorgerufen.

Eine Studie von Mujahid et al. hat sich ebenfalls mit der Rolle von *rli47* bei der Stressantwort von *L. monocytogenes* befasst (Mujahid et al., 2013). Die Autoren haben sich der sRNA von dem Aspekt ausgehend genähert, dass sie in Abhängigkeit von dem alternativen Sigma-Faktor B SigB exprimiert und hochreguliert wird. Die sRNA *rli47* wird deshalb in Analogie zu den anderen SigB-abhängigen sRNAs *sbrA* – *sbrD* (Nielsen et al., 2008) auch als *sbrE* (sigma-B dependent RNA E) bezeichnet (Oliver et al., 2009). Die Arbeitsgruppe um Mujahid hat das Wachstum und Überleben der Deletionsmutante unter verschiedenen Stressbedingungen getestet. Dabei wurde nicht wie in dieser Arbeit *L. monocytogenes* EGD-e, sondern der Strang 10403S verwendet. Untersucht wurde das Wachstum unter oxidativem Stress, Säurestress, Salzstress, Glukosereduktion und bei 7 °C für 12 Tage. Die Deletion von *sbrE* hatte unter allen genannten Bedingungen keine signifikante Auswirkung auf das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Die Versuche von Mujahid et al. und dieser Arbeit ergänzen sich und bieten ein umfassendes Bild zum Wachstumsverhalten dieser Mutante. Während die Studie einen breiten Einblick in möglichst verschiedene Stressbedingungen geben will, wobei das Wachstum bei Kälte nur ein Aspekt ist, bietet diese Arbeit ausgehend von der Stressbedingung Kälteschock ein detaillierteres Verständnis für diesen Teilbereich.



Die Ergebnisse der Studie ergänzen und bestätigen die Einschätzung, dass eine Deletion von *rli47* zu keinen Einschränkungen im Wachstum von *L. monocytogenes* führt. Das Resümee des Artikels ist daher, dass die SigB-abhängige Transkription von *SbrE* die Genexpression nur im Sinne eines Feintunings beeinflusst bzw. nur unter bestimmten, noch nicht definierten Umweltbedingungen (Mujahid et al., 2013).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die sRNA deutlich hochreguliert ist zum Zeitpunkt 24 h nach Kälteschock. Dennoch konnte unter den getesteten Stressbedingungen keine Einschränkung im Wachstum nachgewiesen werden. Es müssten also noch weitere evtl. extremere Bedingungen getestet werden um einen Phänotyp zu finden. Weitere Versuche sind nötig – z. B. mit einer Überexpression von *rli47* – um die Rolle von *rli47/sbrE* bei der Stressreaktion und speziell bei der Kälteadaptation von *L. monocytogenes* besser zu verstehen.

Neben dem Wachstum unter Stressbedingungen lag ein weiterer Schwerpunkt der Studie von Mujahid et al. auf der Regulation von *rli47* durch SigB. Oliver et al. beschrieben in *L. monocytogenes* 10403S, neben 96 Genen mit SigB-abhängiger Transkription, dass die sRNA, *rli47* bzw. *sbrE*, SigB-abhängig ist. Sie identifizierten einen SigB-abhängigen Promotor stromaufwärts des Transkripts und einen rho-unabhängigen Terminator. Für eine direkte Regulation durch SigB sprechen 186fach höhere Transkriptlevel von *rli47* im Elternstrang als in der *sigB*-Deletionsmutante. Die RNA-Seq Ergebnisse konnten mit RT-PCR bestätigt werden (Oliver et al., 2009). Damit belegten sie die Ergebnisse einer vorangegangenen Microarray-Studie (Toledo-Arana et al., 2009). Der alternative Sigma-Faktor Sigma B ist in die Regulation der Stressantwort und Virulenz von *L. monocytogenes* involviert. Darüber hinaus wird seine Aktivität in Abhängigkeit von einem Abfall der Wachstumstemperatur induziert. Die Experimente ließen weiterhin vermuten, dass die Aktivierung von SigB bei Kälte zur Akkumulation von Betain und Carnitin beiträgt, die als Kälteprotektoren fungieren (Becker et al., 1998). Untersuchungen zur Rolle von SigB bei der Adaptation an das Wachstum bei niedrigen Temperaturen zeigten, dass SigB von Zellen in der stationären Phase zur Anpassung an den Temperaturabfall benötigt wird, nicht jedoch von Zellen, die sich in der log-Phase befinden. Die Autoren vermuten deshalb zwei unabhängige Pfade der Adaptation an niedrige Wachstumstemperaturen, die, je nachdem in welcher Wachstumsphase die Zellen sich gerade befinden, SigB-abhängig oder SigB-unabhängig sind (Becker et al., 2000). Für eine Beteiligung von SigB bei der

Kälteanpassung spricht auch eine Studie, in der das Wachstum von zwei *L. monocytogenes* Serotypen bei 4 °C untersucht wurde (Moorhead und Dykes, 2004). Im Gegensatz dazu stellten Chan et al. fest, dass SigB zum Wachstum bei 4 °C nicht benötigt wird. Dennoch wird die Aktivität von SigB während 30-minütigem Wachstum bei 4 °C induziert. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise abhängig vom verwendeten Medium und weiteren experimentellen Abweichungen. Sie untersuchten außerdem, ob SigB an der Regulation von Genen, die in Kälteschock involviert sind, beteiligt ist. Der Studie nach ist die Transkription einiger Kälteschockgene (*opuCA*, *fri* und *oppA*) SigB-unabhängig, während *bsh* und *ltrC* beim Wachstum bei 4 °C SigB-abhängig transkribiert werden (Chan et al., 2007a).

Die Aktivierung von SigB bei Kälte sowie die erhöhte Expression von *rli47* bei Kälte lassen vermuten, dass *rli47* als SigB-regulierte sRNA eine Rolle beim Kältewachstum und bei der Virulenz von *L. monocytogenes* bei Kälte spielen könnte. Weitere Experimente wären nötig um einen direkten Zusammenhang zu untersuchen. Denkbar wäre es z. B., die Expression von *rli47* nach Kälteschock in der *sigB*-Deletionsmutante zu untersuchen.

Neben *rli47* wurden weitere sRNAs identifiziert, die durch SigB reguliert werden: Toledo-Arana et al. zeigten, dass *sbrA* und *rli33* in einer *sigB*-Deletionsmutante genau wie *rli47* dreifach weniger exprimiert werden, d. h. durch SigB positiv reguliert werden. *Rli44* hingegen wird durch SigB negativ reguliert und ist in der Mutante dreifach hochreguliert (Toledo-Arana et al., 2009). Wurtzel et al. erweiterten die Liste der SigB-regulierten sRNAs um *rli118*, *rli119*, *rli127* und *rli128*. Diese vier sRNAs werden in *L. monocytogenes*  $\Delta sigB$  nicht exprimiert (Wurtzel et al., 2012).

Vergleichbar mit *sbrE* ist *sbrA*. Diese sRNA wurde von Nielsen et al. identifiziert und es wurde nachgewiesen, dass sie SigB-abhängig exprimiert wird. Die Autoren stellten außerdem eine Deletionsmutante  $\Delta sbrA$  her und testeten das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Stressbedingungen, darunter auch niedrige Temperatur. Es konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden, also kein Phänotyp aufgrund der Deletion von *sbrA*. Die Autoren vermuten deshalb, dass die sRNA nur für das Feintuning der Genexpression eine Rolle spielt oder nur unter sehr speziellen, bislang nicht untersuchten Bedingungen einen Phänotyp zeigt (Nielsen et al., 2008).

## 4.5 Zellkultur

Nach oraler Aufnahme von Lebensmitteln, die mit Listerien kontaminiert sind, müssen die Bakterien im Darm eine Schicht von Epithelzellen durchdringen, um eine Infektion hervorzurufen. Die Invasion von Epithelzellen lässt sich im Zellkulturmodell mit Caco-2-Zellen gut untersuchen. Diese Zelllinie wurde aus einem Kolonkarzinom isoliert und hat als entartete Zelle die Eigenschaft, sich unendlich zu teilen und weist eine gesteigerte Proliferation auf.

Die Caco-2-Zellen wurden mit dem Wildtyp EGD-e und der sRNA-Deletionsmutante  $\Delta rli47$  infiziert und die Invasionsrate bestimmt. Die Invasionsrate von EGD-e ist für die Auswertung als Vergleichswert für die Deletionsmutante von Interesse und wird deshalb normalisiert. Die Fragestellung bei diesem Versuch ist, ob die Deletion dieser sRNA eine Auswirkung auf die Invasionsfähigkeit von *L. monocytogenes* in Caco-2-Zellen nach dem Kälteschock hat. Zunächst wurde der Versuch unter Standardbedingungen mit einer Inkubation der Bakterienkulturen bei 37 °C durchgeführt. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Eine Deletion der sRNA *rli47* hat also schon unter optimalen Temperaturbedingungen negative Auswirkungen auf die Invasionsfähigkeit in Caco-2-Zellen. Ebenso sieht es aus, wenn die Zellen mit Bakterien infiziert werden, die dem Kälteschock unterzogen und für 24 h bei 15 °C inkubiert wurden. Die Mutante zeigt nach Kälteadaptation eine signifikant reduzierte Invasionsfähigkeit in Caco-2-Zellen im Vergleich zum Wildtyp.

Ivy et al. haben den Einfluss von Temperatur auf die Invasionsfähigkeit und die beteiligten Gene und Regulatoren wie SigB und PrfA untersucht. Sie konnten zeigen, dass *L. monocytogenes* eine höhere Invasionsrate in Caco-2-Zellen hat, wenn sie zuvor bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C herangewachsen sind als bei 37 °C (Ivy et al., 2010). Als ursächlich wird eine vermehrte Flagellinsynthese bei 30 °C diskutiert. Diese Ergebnisse lassen sich nicht direkt auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragen bzw. damit vergleichen. Abgesehen von den unterschiedlichen Versuchsbedingungen – die als Kälte definierte Temperatur ist bei Ivy et al. 30 °C und in dieser Arbeit 15 °C – wurde die Invasionsrate des Wildtyps in dieser Arbeit als 100% festgelegt. Die Fragestellung und daraus folgend die Versuchsanordnung zielte nicht auf einen Vergleich der Invasionsfähigkeit von EGD-e bei den unterschiedlichen

Temperaturbedingungen ab, sondern auf die Untersuchung der sRNA *rli47*. Es lässt sich aber folgender Unterschied feststellen: Den Untersuchungen von Ivy et al. zu Folge erhöht sich die Invasionsfähigkeit des Wildtyps nach Kälteexposition. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die Invasionsfähigkeit der Mutante  $\Delta rli47$  sowohl nach Inkubation bei 37 °C als auch nach Kälteexposition im Vergleich zum Wildtyp signifikant verschlechtert.

Der Versuch zeigt, dass eine Regulation durch die sRNA vorliegt. Diese ist nach Kälteexposition stärker ausgeprägt als nach optimalen Wachstumsbedingungen (Reduktion der Invasionsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp bei 37 °C auf 85 % und nach Kälteadaptation auf 73 %). Der Unterschied zwischen der Invasionsfähigkeit der Mutante bei den verschiedenen Bedingungen ist zwar nicht signifikant, die Tendenz ist jedoch erkennbar. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass *rli47* an der Virulenz von *L. monocytogenes* in Caco-2-Zellen beteiligt ist. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Einfluss von *rli47* nach Kälteadaptation größer ist als bei 37 °C. Es bleibt zu klären, welche Mechanismen dafür verantwortlich sind. Ein direkter Einfluss auf die Beweglichkeit mittels Flagellin durch *rli47* konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Gegenstand weiterer Untersuchungen könnte sein, inwiefern die sRNA andere Virulenzfaktoren wie z. B. Internaline, die für die Invasion in Caco-2-Zellen benötigt werden, beeinflusst.

Beispiele für sRNAs in *L. monocytogenes*, für die eine Beteiligung an der Virulenz sowohl in der Zellkultur als auch im Mausmodell nachgewiesen wurde, sind *rli31*, *rli33-I* und *rli50* (Mraheil et al., 2011) sowie *rli60* (Peng et al., 2014). Der Einfluss von Kälte auf das Ausmaß der Virulenz war jedoch nicht Teil der Untersuchungen.

## 4.6 Infektion von *Galleria mellonella*

Die Infektion von Larven der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* ist als Modell zur Untersuchung der Virulenz von *L. monocytogenes* etabliert (Mukherjee et al., 2009; Joyce und Gahan, 2010). Basierend auf der RNA-Analyse wurde aus oben genannten Gründen die sRNA *rli47* für diesen Infektionsversuch ausgewählt. Die Fragestellung war, ob die Deletion von *rli47* einen Einfluss auf die Virulenz von *L. monocytogenes* in *G. mellonella* 24 h nach Kälteschock hat. Als Referenz diente der Wildtyp EGD-e, außerdem wurde der Versuch zum Vergleich unter Standardbedingungen (Inkubation der Bakterienkulturen vor der Infektion bei 37 °C) durchgeführt.

Die Überlebenskurve bei 37 °C zeigt keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Die Ergebnisse für EGD-e unterscheiden sich von den von Mukherjee et al. publizierten (Mukherjee et al., 2009). Während in der Publikation im Durchschnitt nur 40 % der Larven überlebten, sind es hier 70 %. Die Ergebnisse bilden die Ergebnisse von mindestens drei biologischen Replikaten ab und die niedrige Standardabweichung zeigt, dass der Versuch reproduzierbar war. Die abweichenden Ergebnisse lassen sich am ehesten auf unterschiedliche Handhabung bei ansonsten gleichem Versuchsprotokoll zurückführen. Da der Versuch bei 37 °C in dieser Arbeit nicht im Fokus der Fragestellung steht, werden die möglichen Gründe für die Abweichung hier nicht weiter diskutiert.

Betrachtet man die Überlebenskurve 24 h nach Kälteschock, lassen sich zwei Erkenntnisse gewinnen: Zum einen wird deutlich, dass die Deletion der sRNA *rli47* keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von *L. monocytogenes* während der Infektion der Larven hat. Zum anderen zeigt sich jedoch – unabhängig von der ursprünglichen Fragestellung nach der Rolle der sRNA – ein bisher nicht beschriebenes Phänomen nach Kälteexposition von *L. monocytogenes* EGD-e: die Virulenz sowohl von Wildtyp als auch sRNA-Deletionsmutante ist 24 h nach Kälteschock signifikant höher als bei 37 °C. Dieser Effekt zeigt sich sowohl zwischen den beiden im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Kurven als auch im Vergleich der „Kälte-Kurve“ aus dieser Arbeit mit der 37 °C-Überlebenskurve von Mukherjee et al. Es lässt sich feststellen, dass *L. monocytogenes* durch das Wachstum bei 15 °C aggressiver, d. h. virulenter wird. Aufgrund der Versuchsanordnung und der Auswahl der Mutante  $\Delta rli47$  wurde nur der Zeitpunkt 24 h nach Kälteschock untersucht. Durch die lange Inkubationszeit bei 15 °C im Anschluss an den Temperaturabfall werden hier nicht mehr die unmittelbaren Auswirkungen des Schocks untersucht, da sich das Wachstum zu diesem Zeitpunkt schon wieder normalisiert hat. Vielmehr handelt es sich hier um eine Kälteadaptation und deren Folgen. Interessant wäre es weitere Infektionsversuche nur mit dem Wildtyp unmittelbar, d. h. 1 und 2 h, nach Kälteschock durchzuführen. Ist die erhöhte Virulenz spezifisch für permanentes Kältewachstum oder lassen sich die Ergebnisse auf das Wachstum der Bakterien bei Kälte allgemein zurückführen? Findet sich unmittelbar nach Kälteschock ein ähnliches oder sogar noch extremeres Ergebnis in der Überlebenskurve der Larven? Weitere Untersuchungen im Vertebratenmodell könnten sich anschließen. Ursachen für die gesteigerte Virulenz von *L. monocytogenes* nach

Inkubation bei Kälte könnten z. B. die gesteigerte Flagellinsynthese bei niedrigen Temperaturen (Peel et al., 1988) und die Induktion von Kälteschockproteinen und deren Einfluss auf die Synthese von Listeriolysin sein (Schärer et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Virulenz von *L. monocytogenes* im Gallerienmodell nach 24-stündigem Wachstum bei 15 °C im Vergleich zu 37 °C erhöht ist. Dies lässt sich jedoch nicht auf die sRNA *rli47* zurückführen. Ob andere sRNAs dabei eine Rolle spielen, lässt sich nicht ausschließen und bedarf weiterer Untersuchungen. Da aber mit *rli47* 24 h nach Kälteschock die sRNA und der Zeitpunkt mit der stärksten Änderung der Sequenzanzahl ausgewählt wurde, ist die Wahrscheinlichkeit eher gering, durch die Deletion weiterer sRNAs, deren Expression weniger stark beeinflusst ist, signifikante Unterschiede zum Wildtyp zu finden.

#### 4.7 Regulation von sRNAs bei Kälte

Die Regulation von sRNAs in *L. monocytogenes* bei Kälte wurde von Toledo-Arana et al. untersucht. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde Kälte in dieser Studie als 30 °C definiert. Die Ergebnisse sind deshalb nur eingeschränkt vergleichbar. Es ist zu vermuten, dass bei einer niedrigeren Temperatur die Regulation stärker ausgeprägt ist. Toledo-Arana et al. haben bei 30 °C in BHI sRNAs relative Expression im Vergleich zur Referenz bei 37 °C untersucht (Toledo-Arana et al., 2009). In der Studie wurden 50 sRNAs untersucht, darunter sieben, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden: *ssrS*, *ssrA*, *rnpB*, *rli47*, *rli29*, *rli31* und *rli33*. Es zeigte sich, dass *rli30* dreifach herunterreguliert ist, während *rli43* und *rli44* dreifach hochreguliert sind. Bei allen anderen untersuchten sRNAs gab es keine Veränderung der Expression im Vergleich zur Referenzbedingung.

In *E. coli* sind die beiden sRNAs ECS010 und ECS025 nach Kälteschock – in dieser Studie definiert als 30 min bei 15 °C nach vorherigem Wachstum bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 – stärker exprimiert (Shinhara et al., 2011). Die *trans*-kodierte sRNA SR1 in *B. subtilis* wird durch Kälte reguliert. Nach einem Kälteschock auf 18 °C war die Synthese der sRNA signifikant reduziert, was auf eine veränderte Initiation der Transkription zurückzuführen ist (Brantl und Brückner, 2014). In einer Transkriptomanalyse des Archaeon *Methanobrevibacter smithii* wurden 195 sRNAs detektiert und für einige davon die Kälteinduktion bei 8 °C mittels Northern Blot bestätigt (Li et al., 2015). Eine Charakterisierung von sRNAs in *Corynebacterium*

*glutamicum* ATCC 13032 beinhaltet deren Regulation unter verschiedenen Stressbedingungen, darunter nach Kälteschock auf 10 °C (Mentz et al., 2013). Diese Beispiele zeigen, dass die Transkription von sRNAs in verschiedenen Organismen durch Kälte reguliert wird. Eine regulatorische Beteiligung von sRNAs an der Kälteanpassung ist daher naheliegend, zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

Ein weiteres Beispiel für eine Regulation durch Temperaturänderungen ist PrfA. Normalerweise werden die Virulenzgene bei 37 °C exprimiert, während sie bei 30 °C kaum exprimiert werden. Reguliert wird die Expression durch eine UTR, die PrfA vorausgeht und in Abhängigkeit von der Temperatur ihre Sekundärstruktur verändert. Bei niedrigen Temperaturen verändert sich die Struktur so, dass der nachfolgende Genabschnitt für PrfA nicht abgelesen werden kann und deshalb keine Virulenzgene exprimiert werden (Johansson et al., 2002; Loh et al., 2009). Neben PrfA in *L. monocytogenes* gibt es weitere Beispiele für die Reaktion von Bakterien auf Temperaturänderungen durch RNA-Thermometer. Diese RNA-Thermometer sind an der Kälteschockantwort z. B. in Form von Proteinproduktion beteiligt. Der Vorteil der Regulation durch RNA-Elemente gegenüber Signaltransduktions-Systemen ist, dass die Reaktion viel schneller erfolgen kann. So wird das Gen für CspA in *E. coli* durch ein RNA-Thermometer in der 5' UTR reguliert. Nach einer Temperaturveränderung von 37 auf 10 °C formt die 5' UTR eine veränderte Sekundärstruktur, die die Stabilität und Translation der mRNA erhöht (Giuliodori et al., 2010). Die sRNA *dsrA* in *E. coli* fungiert ebenfalls als RNA-Thermometer. In Abhängigkeit von der Temperatur reguliert sie das Sigma-Faktor RpoS Regulon in Form einer Aktivierung bei Kälte (Repoila und Gottesman, 2001; Repoila und Gottesman, 2003).

## 4.8 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Regulation der Expression von sRNAs in *L. monocytogenes* nach Kälteschock und Kälteadaptation stattfindet. Dennoch hat die Deletion einzelner sRNAs unter den getesteten Bedingungen größtenteils keine phänotypischen Auswirkungen. Für einige sRNAs werden unter bestimmten Bedingungen Tendenzen erkennbar. Eine Rolle in der Virulenz kommt *rli47* bei der Invasion in Caco-2-Zellen zu, die sich jedoch sowohl unter Standard- als auch unter Kältebedingungen findet.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass sRNAs bei der Kälteschockantwort und Kälteadaptation von *L. monocytogenes* eher eine Rolle als Feinregulatoren zuzuschreiben ist oder ihre Funktion nur unter eng umgrenzten Bedingungen erkennbar wird. Wie in den jeweiligen Kapiteln beschrieben, sind für die einzelnen sRNAs weitere Experimente denkbar, um ihre Rolle genauer zu definieren. Die Bedeutung von Netzwerken mehrerer sRNAs ist ein weiterer Aspekt, der im Fokus zukünftiger Untersuchungen stehen könnte.

Die Target-Analyse gibt erste Hinweise auf mögliche Interaktionen zwischen sRNAs und mRNA-Zielstrukturen. An welche dieser Zielstrukturen die sRNAs tatsächlich binden und welche Auswirkungen sich daraus für den Stoffwechsel der Listerien ergeben, muss noch untersucht werden. Möglicherweise können bei genauerer Kenntnis darüber Methoden entwickelt werden, um die sRNA/mRNA-Bindung zu blockieren und so das bakterielle Wachstum bei Kälte zu inhibieren.



## 5 Zusammenfassung

*Listeria monocytogenes* kann durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel bei Schwangeren, Neugeborenen, alten und immunsupprimierten Patienten eine potentiell tödlich verlaufende Listeriose hervorrufen. Von großer Bedeutung ist dabei die Fähigkeit der Bakterien, sich auch bei Kühlschranktemperaturen vermehren zu können. Um Kontaminationen und Krankheitsfälle einzudämmen ist es notwendig, die molekularen Mechanismen, die Wachstum und Virulenz bei niedrigen Temperaturen ermöglichen, zu verstehen. Welche Rolle kleine nichtkodierende RNAs dabei spielen, ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

Eine dieser Arbeit vorangegangene RNA-Sequenzierung hatte ergeben, dass sRNAs bei 37 °C und 1 h, 2 h und 24 h nach einem Kälteschock von 37 auf 15 °C differentiell exprimiert werden. Auf dieser Grundlage wurden besonders stark regulierte sRNAs ausgewählt und näher charakterisiert. Die Deletion einzelner sRNAs zeigte bis auf wenige Ausnahmen keine signifikanten Auswirkungen auf das Wachstum nach Kälteschock und bei permanentem Kältewachstum bei 4 und 15 °C. Mit RT-PCR und qRT-PCR konnten die Transkriptionsprofile der RNA-Sequenzierung für *rli44*, *rli47*, *rli78*, FMN, *ssrA*, *ssrS* und *rnpB* nur teilweise bestätigt werden. Eine Proteinanalyse der sRNA-Deletionsmutanten  $\Delta rli78$ ,  $\Delta rli50^*$ ,  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  und  $\Delta rli47$  ergab nach Kälteschock keine Unterschiede zum Wildtyp und zu 37 °C. Die sRNA *rli47* ist nach 24-stündigem Wachstum bei 15 °C besonders stark hochreguliert und wurde deshalb in Infektionsversuchen untersucht. Die Invasionsfähigkeit der Mutante in Caco-2-Zellen war 24 h nach Kälteschock signifikant schlechter als die des Wildtyps EGD-e, ebenso unter Standardbedingungen bei 37 °C. Bei der Infektion der Wachsmotte *Galleria mellonella* zeigten sich keine Unterschiede in der Virulenz zwischen Mutante und Wildtyp. Auffällig war jedoch eine niedrigere Überlebensrate der Larven nach Infektion sowohl mit Wildtyp als auch Mutante nach dem Kälteschock als unter Standardbedingungen bei 37 °C.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass einzelne sRNAs an Wachstum und Virulenz von *L. monocytogenes* unter bestimmten Kältebedingungen beteiligt sind. Eine Deletion des Großteils der untersuchten sRNAs führte jedoch unter den getesteten Konditionen zu keinen phänotypischen Auswirkungen.

## 6 Summary

*Listeria monocytogenes* is able to cause the potentially deadly illness listeriosis in pregnant women, newborns, the elderly and immunocompromised patients due to the consumption of contaminated food. Therefore, the ability of the bacteria to grow at refrigeration temperatures has significant implications. To reduce contamination and disease outbreaks, it is necessary to understand the molecular mechanisms that enable growth and virulence at low temperatures. Topic of this dissertation is to understand the role of small noncoding RNAs in this connection.

A preceding RNA-sequencing has shown that sRNAs are expressed differentially at a temperature of 37 °C and furthermore 1 h, 2 h, and 24 h after cold shock from 37 to 15 °C. Based on this observation highly regulated sRNAs were selected and characterized in detail. The deletion of individual sRNAs has shown – with few exceptions - no significant implications on their growth after cold shock and at permanent cold growth at temperatures of 4 and 15 °C. The transcription profiles of the RNA-sequencing for *rli44*, *rli47*, *rli78*, *FMN*, *ssrA*, and *rnpB* could only be partially confirmed with the help of RT-PCR and qRT-PCR. A protein analysis of the sRNA deletion mutants  $\Delta rli78$ ,  $\Delta rli50^*$ ,  $\Delta rli78\Delta rli50^*$  and  $\Delta rli47$  has shown no differences to the wildtype after cold shock exposure as well as at a temperature exposure of 37 °C. After growing for 24 h at a temperature of 15 °C the sRNA *rli47* has significantly increased and was therefore selected for infection assays. The mutant's ability to invade Caco-2-cells deteriorated significantly 24 h after cold shock exposure as well as at a temperature of 37 °C compared to that of the wild-type EGD-e. The infection of the greater wax moth *Galleria mellonella* showed no differences in virulence between the mutant and wild-type. However, one point was striking: there was a lower survival rate of the larvae after infection with both wild-type and mutant after the cold shock and under standard conditions of a temperature of 37 °C.

The present study has shown that individual sRNAs are involved in the growth and virulence of *L. monocytogenes* under certain cold temperature conditions. The deletion of the majority of the sRNAs examined here did not result in having any phenotypic implications under the experimental conditions.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin, Ampère
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i> (ATP-bindende Kassette Transporter)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i> (Hirn-Herz-Bouillon)
bp	Basenpaar(e)
BPB	<i>Bacto Perassau Broth</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Csp	<i>cold shock protein</i> (Kälteschockprotein)
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
<i>flaA</i>	Gen, das für Flagellin kodiert
FMN	Flavinmononukleotid
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung, Gramm
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i> (große Wachsmotte)
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
kb	Kilobase

KBE	koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
L	Liter
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
<i>lmo</i>	Gen in <i>L. monocytogenes</i>
M	Molar (mol/L)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PrfA	positiver Regulationsfaktor
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
<i>rli</i>	RNA <i>Listeria</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNA-Seq	<i>RNA sequencing</i> (RNA-Sequenzierung)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
s	Sekunde(n)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SigB	Sigma-Faktor B
sp.	Species
sRNA	<i>small (noncoding) RNA</i> (kleine nichtkodierende RNA)
T	Thymin
Tab.	Tabelle

TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenkonzentration
w/v	Massenkonzentration
$\Delta$	Deletion
$\infty$	unendlich

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1 Listeriose. ....	3
Abb. 3.1 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium bei 4 °C und 180 rpm.....	42
Abb. 3.2 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium mit Zusatz von 5 % Ethanol bei 4 °C und 180 rpm.....	43
Abb. 3.3 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium mit Zusatz von 0,045 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei 4 °C und 180 rpm.....	44
Abb. 3.4 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium bei 15 °C und 180 rpm.....	45
Abb. 3.5 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium bei 15 °C und 180 rpm.....	45
Abb. 3.6 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und der sRNA-Deletionsmutante $\Delta rli47$ bei 15 °C und 180 rpm nach Kälteschock von 37 auf 15 °C. ....	46
Abb. 3.7 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium bei 15 °C und 180 rpm 24 h nach Kälteschock von 37 auf 15 °C.....	47
Abb. 3.8 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium mit 5 % Ethanol bei 15 °C und 180 rpm 24 h nach Kälteschock von 37 auf 15 °C.....	48
Abb. 3.9 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten in BHI-Medium mit 0,045 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei 15 °C und 180 rpm 24 h nach Kälteschock von 37 auf 15 °C.....	49
Abb. 3.10 Normalisierte KBE/ml von EGD-e und sRNA-Mutanten nach Wachstum bei 15 °C für 2 h nach Kälteschock.....	50
Abb. 3.11 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf BHI-Agarplatten bei 15 °C für 2 Tage. ....	52

Abb. 3.12 Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf BHI-Agarplatten bei 4 °C für 30 Tage. ....	53
Abb. 3.13 Schwärmverhalten von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf Weichagar bei 37 °C für 2 Tage. ....	54
Abb. 3.14 Schwärmverhalten von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf Weichagar bei 15 °C für 5 Tage. ....	55
Abb. 3.15 Schwärmverhalten von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten auf Weichagar bei 4 °C für 30 Tage. ....	56
Abb. 3.16 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und <i>rli44</i> (175 bp).....	57
Abb. 3.17 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und <i>rli47</i> (249 bp).....	57
Abb. 3.18 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und <i>rli78</i> (123 bp).....	58
Abb. 3.19 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und FMN (156 bp).....	58
Abb. 3.20 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und <i>ssrA</i> (442 bp).....	58
Abb. 3.21 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und <i>ssrS</i> (94 bp).....	59
Abb. 3.22 RT-PCR von 16S rRNA (318 bp) und <i>rnpB</i> (245 bp).....	59
Abb. 3.23 qRT-PCR von 16S rRNA.....	60
Abb. 3.24 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von <i>rli44</i> mit RNA-Seq.....	60
Abb. 3.25 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCT von <i>rli47</i> mit RNA-Seq.....	60
Abb. 3.26 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von <i>rli78</i> mit RNA-Seq.....	61
Abb. 3.27 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von FMN mit RNA-Seq.....	61
Abb. 3.28 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von <i>ssrA</i> mit RNA-Seq.....	61
Abb. 3.29 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von <i>ssrS</i> mit RNA-Seq.....	62
Abb. 3.30 Vergleich der Ergebnisse der qRT-PCR von <i>rnpB</i> mit RNA-Seq.....	62
Abb. 3.31 Zellwandproteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten bei 37 °C und 1 h, 2 h und 24 h nach Kälteschock. ....	63

Abb. 3.32 Überstandsproteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten bei 37 °C und 1 h, 2 h und 24 h nach Kälteschock. ....	65
Abb. 3.33 Zytoplasmatische Proteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und sRNA-Deletionsmutanten bei 37 °C und 1 h, 2 h und 24 h nach Kälteschock. ....	66
Abb. 3.34 Invasionsverhalten von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, <i>L. monocytogenes</i> $\Delta rli47$ und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta InlA/B$ in Caco-2-Zellen bei 37 °C. ....	68
Abb. 3.35 Invasionsverhalten von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, <i>L. monocytogenes</i> $\Delta rli47$ und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta inlA/B$ in Caco-2-Zellen 24 h nach dem Kälteschock. ....	68
Abb. 3.36 Überlebenskurve von <i>Galleria mellonella</i> nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und der sRNA-Deletionsmutante $\Delta rli47$ bei 37 °C. ....	69
Abb. 3.37 Überlebenskurve von <i>Galleria mellonella</i> nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und der sRNA-Deletionsmutante $\Delta rli47$ 24 h nach Kälteschock. ....	70
Tab. 2.1 Deletionsmutanten .....	19
Tab. 2.2 Oligonukleotide.....	25
Tab. 2.3 Geräte .....	26
Tab. 2.4 Pipettierschema für OneStep RT-PCR.....	32
Tab. 2.5 Programm der OneStep RT-PCR.....	33
Tab. 2.6 Pipettierschema für qRT-PCR .....	33
Tab. 2.7 Programm der qRT-PCR.....	34
Tab. 2.8 BSA-Standardreihe für 24 $\mu$ l Endvolumen.....	37



## 9 Literaturverzeichnis

- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, Darrell O., Labeda, David P., and Wilkinson, B.J. (1997) Critical role of Anteiso-C15:0 Fatty Acid in the Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures. *Appl Environ Microbiol* 63 (10): 3887–3894.
- Barria, C., Malecki, M., and Arraiano, C.M. (2013) Bacterial adaptation to cold. *Microbiology* 159 (Pt 12): 2437–2443.
- Barry, T., Kelly, M., Glynn, B., and Peden, J. (1999) Molecular cloning and phylogenetic analysis of the small cytoplasmic RNA from *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 173 (1): 47–53.
- Bécavin, C., Bouchier, C., Lechat, P., Archambaud, C., Creno, S., Gouin, E., et al. (2014) Comparison of Widely Used *Listeria monocytogenes* Strains EGD, 10403S, and EGD-e Highlights Genomic Differences Underlying Variations in Pathogenicity. *MBio* 5 (2): 00969-14.
- Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W., and Benson, A.K. (1998) Identification of the Gene Encoding the Alternative Sigma Factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and Its Role in Osmotolerance. *J Bacteriol* 180 (17): 4547–4554.
- Becker, L.A., Evans, S.N., Hutkins, R.W., and Benson, A.K. (2000) Role of sigmaB in Adaptation of *Listeria monocytogenes* to Growth at Low Temperature. *J Bacteriol* 182 (24): 7083–7087.
- Beckering, C.L., Steil, L., Weber, M.H.W., Volker, U., and Marahiel, M.A. (2002) Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184 (22): 6395–6402.
- Behrens, S., Widder, S., Mannala, G.K., Qing, X., Madhugiri, R., Kefer, N., et al. (2014) Ultra Deep Sequencing of *Listeria monocytogenes* sRNA Transcriptome Revealed New Antisense RNAs. *PLoS ONE* 9 (2): e83979.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C., and Meile, L. (2013) *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol* 63 (Pt 2): 526–532.
- Brantl, S. (2008) *Cis* und *trans*: Genregulation in Bakterien. *BIOspektrum* 14.
- Brantl, S., and Brückner, R. (2014) Small regulatory RNAs from low-GC Gram-positive bacteria. *RNA Biol* 11 (5).
- Cairrão, F., Cruz, A., Mori, H., and Arraiano, C.M. (2003) Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Mol Microbiol* 50 (4): 1349–1360.
- Chan, Y.C., Boor, K.J., and Wiedmann, M. (2007a) SigmaB-Dependent and sigmaB-Independent Mechanisms Contribute to Transcription of *Listeria monocytogenes* Cold Stress Genes during Cold Shock and Cold Growth. *Appl Environ Microbiol* 73 (19): 6019–6029.
- Chan, Y.C., Raengpradub, S., Boor, K.J., and Wiedmann, M. (2007b) Microarray-Based Characterization of the *Listeria monocytogenes* Cold Regulon in Log- and Stationary-Phase Cells. *Appl Environ Microbiol* 73 (20): 6484–6498.

- Chan, Y.C., and Wiedmann, M. (2008) Physiology and Genetics of *Listeria monocytogenes* Survival and Growth at Cold Temperatures. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49 (3): 237–253.
- Christiansen, J.K., Larsen, M.H., Ingmer, H., Søgaaard-Andersen, L., and Kallipolitis, B.H. (2004) The RNA-Binding Protein Hfq of *Listeria monocytogenes* Role in Stress Tolerance and Virulence. *J Bacteriol* 186 (11): 3355–3362.
- Christiansen, J.K., Nielsen, J.S., Ebersbach, T., Valentin-Hansen, P., Søgaaard-Andersen, L., and Kallipolitis, B.H. (2006) Identification of small Hfq-binding RNAs in *Listeria monocytogenes*. *RNA* 12 (7): 1383–1396.
- Cossart, P., and Toledo-Arana, A. (2008) *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* 10 (9): 1041–1050.
- de las Heras, Aitor, Cain, R.J., Bielecka, M.K., and Vázquez-Boland, J.A. (2011) Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr Opin Microbiol* 14 (2): 118–127.
- den Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A.F., Ahlstrom, C., Manuel, C.S., et al. (2014) *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 64 (Pt 6): 1882–1889.
- Duffy, L.L., Vanderlinde, P.B., and Grau, F.H. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. *Int J Food Microbiol* 23 (3-4): 377–390.
- Eggenhofer, F., Tafer, H., Stadler, P.F., and Hofacker, I.L. (2011) RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets. *Nucleic Acids Res* 39 (Web Server): W149-W154.
- Erdmann, G., and Potel, J. (1953) Listeriose der Neugeborenen: Granulomatosis infantiseptica: (bisher die sogenannte Pseudotuberkulose bzw. Agryrophilen-Sepsis). *Zeitschrift für Kinderheilkunde* 73 (8): 113–132.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 - food- and waterborne diseases and zoonoses. Stockholm: ECDC; 2014.
- Farber, J.M., and Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol Rev* 55 (3): 476–511.
- Ghobakhloo, A., Laberge, S., Antoun, H., Wishart, D.S., Xia, J., Krishnamurthy, R., and Mandal, R. (2013) Metabolomic Analysis of Cold Acclimation of Arctic *Mesorhizobium* sp. Strain N33. *PLoS ONE* 8 (12): e84801.
- Giuliodori, A.M., Di Pietro, F., Marzi, S., Masquida, B., Wagner, R., Romby, P., et al. (2010) The *cspA* mRNA is a Thermosensor that Modulates Translation of the Cold-Shock Protein CspA. *Mol Cell* 37 (1): 21–33.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., et al. (2001) Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science* 294 (5543): 849–852.
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., et al. (2010) *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 60 (6): 1280–1288.

- Gripenland, J., Netterling, S., Loh, E., Tiensuu, T., Toledo-Arana, A., and Johansson, J. (2010) RNAs: regulators of bacterial virulence. *Nat Rev Microbiol* 8 (12): 857–866.
- Gründling, A., Burrack, L.S., Bouwer, H.G.A., and Higgins, D.E. (2004) *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (33): 12318–12323.
- Hain, T., Chatterjee, S.S., Ghai, R., Kuenne, C.T., Billion, A., Steinweg, C., et al. (2007) Pathogenomics of *Listeria* spp. *Int J Med Microbiol* 297 (7-8): 541–557.
- Hernandez-Milian, A., and Payeras-Cifre, A. (2014) What is new in listeriosis? *Biomed Res Int* 2014: 358051.
- Hoe, C.-H., Raabe, C.A., Rozhdestvensky, T.S., and Tang, T.-H. (2013) Bacterial sRNAs: Regulation in stress. *Int J Med Microbiol* 303 (5): 217–229.
- Hof, H. (2003) History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35 (3): 199–202.
- Ivy, R.A., Chan, Y.C., Bowen, B.M., Boor, K.J., and Wiedmann, M. (2010) Growth Temperature-Dependent Contributions of Response Regulators,  $\sigma^B$ , PrfA, and Motility Factors to *Listeria monocytogenes* Invasion of Caco-2 Cells. *Foodborne Pathog Dis* 7 (11): 1337–1349.
- Janosi, L., Shimizu, I., and Kaji, A. (1994) Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (10): 4249–4253.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002) An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110 (5): 551–561.
- Jones, P.G., Cashel, M., Glaser, G., and Neidhardt, F.C. (1992) Function of a Relaxed-Like State following Temperature Downshifts in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174 (12): 3903–3914.
- Joyce, S.A., and Gahan, C.G.M. (2010) Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology* 156 (Pt 11): 3456–3468.
- Kery, M.B., Feldman, M., Livny, J., and Tjaden, B. (2014) TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res* 42 (W1): W124–W129.
- Klein, W., Weber, M.H.W., and Marahiel, M.A. (1999) Cold Shock Response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine-Dependent Switch in the Fatty Acid Branching Pattern for Membrane Adaptation to Low Temperatures. *J Bacteriol* 181 (17): 5341–5349.
- Krawitz, C. (2011) Charakterisierung von sRNA in *Listeria monocytogenes*. Dissertation. Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Kuchmina, E. (2007) Untersuchungen zur Kälteanpassung bei *Listeria monocytogenes*. Dissertation. Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

- Lang Halter, E., Neuhaus, K., and Scherer, S. (2012) *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a fresh water pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 63 (2): 641–647.
- Lay, N. de, and Gottesman, S. (2012) A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 86 (3): 524–538.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A.D., Le Fleche-Mateos, A., Roche, S.M., et al. (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60 (Pt 9): 2210–2214.
- Li, J., Qi, L., Guo, Y., Yue, L., Li, Y., Ge, W., et al. (2015) Global mapping transcriptional start sites revealed both transcriptional and post-transcriptional regulation of cold adaptation in the methanogenic archaeon *Methanolobus psychrophilus*. *Sci Rep* 5: 9209.
- Loepfe, C., Raimann, E., Stephan, R., and Tasara, T. (2010) Reduced Host Cell Invasiveness and Oxidative Stress Tolerance in Double and Triple *csp* Gene Family Deletion Mutants of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis* 7 (7): 775–783.
- Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., et al. (2009) A trans-acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139 (4): 770–779.
- Mandin, P., Repoila, F., Vergassola, M., Geissmann, T., and Cossart, P. (2007) Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. *Nucleic Acids Res* 35 (3): 962–974.
- Mansjö, M., and Johansson, J. (2011) The Riboflavin analog roseoflavin targets an FMN-riboswitch and blocks *Listeria monocytogenes* growth, but also stimulates virulence gene-expression and infection. *RNA Biol* 8 (4): 674–680.
- Mattila, M., Lindström, M., Somervuo, P., Markkula, A., and Korkeala, H. (2011) Role of *flhA* and *motA* in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Int J Food Microbiol* 148 (3): 177–183.
- Mentz, A., Neshat, A., Pfeifer-Sancar, K., Pühler, A., Rückert, C., and Kalinowski, J. (2013) Comprehensive discovery and characterization of small RNAs in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC Genomics* 14 (1): 714.
- Moorhead, S.M., and Dykes, G.A. (2004) Influence of the *sigB* gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes. *Int J Food Microbiol* 91 (1): 63–72.
- Mraheil, M.A., Billion, A., Mohamed, W., Mukherjee, K., Kuenne, C., Pischmarov, J., et al. (2011) The intracellular sRNA transcriptome of *Listeria monocytogenes* during growth in macrophages. *Nucleic Acids Res* 39 (10): 4235–4248.
- Mujahid, S., Bergholz, T., Oliver, H., Boor, K., and Wiedmann, M. (2013) Exploration of the Role of the Non-Coding RNA SbrE in *L. monocytogenes* Stress Response. *Int J Mol Sci* 14 (1): 378–393.
- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskas, A., and Chakraborty, T. (2009) *Galleria mellonella* as a Model System for Studying *Listeria* Pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 76 (1): 310–317.

- Murray, E.G.D., Webb, R.A., and Swann, M. (1926) A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J Pathol Bacteriol* 29: 407–430.
- Muto, A., Fujihara, A., Ito, K.-i., Matsuno, J., Ushida, C., and Himeno, H. (2000) Requirement of transfer-messenger RNA for the growth of *Bacillus subtilis* under stresses. *Genes to Cells* 5 (8): 627–635.
- Nielsen, J.S., Larsen, M.H., Lillebæk, E.M.S., Bergholz, T.M., Christiansen, M.H.G., Boor, K.J., et al. (2011) A Small RNA Controls Expression of the Chitinase ChiA in *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 6 (4): e19019.
- Nielsen, J.S., Olsen, A.S., Bonde, M., Valentin-Hansen, P., and Kallipolitis, B.H. (2008) Identification of a sigma B-Dependent Small Noncoding RNA in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 190 (18): 6264–6270.
- Oliver, H.F., Orsi, R.H., Ponnala, L., Keich, U., Wang, W., Sun, Q., et al. (2009) Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs. *BMC Genomics* 10 (1): 641.
- Orsi, R.H., Bakker, H.C.d., and Wiedmann, M. (2011) *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol* 301 (2): 79–96.
- Peel, M., Donachie, W., and Shaw, A. (1988) Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria monocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting. *J Gen Microbiol* 134: 2171–2178.
- Peng, Y.-L., Meng, Q.-L., Qiao, J., Xie, K., Chen, C., Liu, T.-L., et al. (2014) The roles of noncoding RNA Rli60 in regulating the virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Immunol Infect*.
- Phadtare, S. (2004) Recent Developments in Bacterial Cold-shock Response. *Curr Issues Mol Biol* 6 (2): 125–136.
- Pinto, M., Rabine-Leon, S., Appay, M.-D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., et al. (1983) Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biol Cell* 47: 323–330.
- Quereda, J.J., Ortega, A.D., Pucciarelli, M.G., and García-Del Portillo, F. (2014) The *Listeria* Small RNA Rli27 Regulates a Cell Wall Protein inside Eukaryotic Cells by Targeting a Long 5'-UTR Variant. *PLoS Genet.* 10 (10): e1004765.
- Repoila, F., and Darfeuille, F. (2009) Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol Cell* 101 (2): 117–131.
- Repoila, F., and Gottesman, S. (2001) Signal Transduction Cascade for Regulation of RpoS: Temperature regulation of DsrA. *J Bacteriol* 183 (13): 4012–4023.
- Repoila, F., and Gottesman, S. (2003) Temperature Sensing by the *dsrA* Promoter. *J Bacteriol* 185 (22): 6609–6614.
- Robert Koch-Institut Epidemiologisches Bulletin 34/2010: 341–350.
- Schärer, K., Stephan, R., and Tasara, T. (2013) Cold shock proteins contribute to the regulation of Listeriolysin O production in *L. monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis* 10 (12): 1023–1029.

- Schlech, W.F. 3rd, et al. (1983) Epidemic Listeriosis - Evidence for Transmission by Food. *N Engl J Med* 308: 203–206.
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M.J., Stephan, R., and Tasara, T. (2009) Role of Cold Shock Proteins in Growth of *Listeria monocytogenes* under Cold and Osmotic Stress Conditions. *Appl Environ Microbiol* 75 (6): 1621–1627.
- Schumann, W., Inouye, M., and Phadtare, S. (2008) Cold-shock Response in Microorganisms. In Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., and Cossart, P. (2013) The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nat Rev Microbiol* 11 (2): 75–82.
- Shin, J.-H., and Price, C.W. (2007) The SsrA-SmpB ribosome rescue system is important for growth of *Bacillus subtilis* at low and high temperatures. *J Bacteriol* 189 (10): 3729–3737.
- Shinhara, A., Matsui, M., Hiraoka, K., Nomura, W., Hirano, R., Nakahigashi, K., et al. (2011) Deep sequencing reveals as-yet-undiscovered small RNAs in *Escherichia coli*. *BMC Genomics* 12 (428).
- Stavru, F., Archambaud, C., and Cossart, P. (2011) Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol Rev* 240 (1): 160–184.
- Stougaard, P., Molin, S., and Nordstrom, K. (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (10): 6006–6012.
- Sun, Y., Wilkinson, B.J., Standiford, T.J., Akinbi, H.T., and O'Riordan, M.X.D. (2012) Fatty acids regulate stress resistance and virulence factor production for *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 194 (19): 5274–5284.
- Suutari, M., and Laakso, S. (1994) Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit Rev Microbiol* 20 (4): 285–324.
- Swaminathan, B., and Gerner-Smidt, P. (2007) The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 9 (10): 1236–1243.
- Thieringer, H.A., Jones, P.G., and Inouye, M. (1998) Cold shock and adaptation. *Bioessays* 20 (1): 49–57.
- Thomason, M.K., Fontaine, F., Lay, N. de, and Storz, G. (2012) A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84 (1): 17–35.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., et al. (2009) The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459: 950–956.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., et al. (2001) *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* 14 (3): 584–640.
- Waters, L.S., and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 136 (4): 615–628.

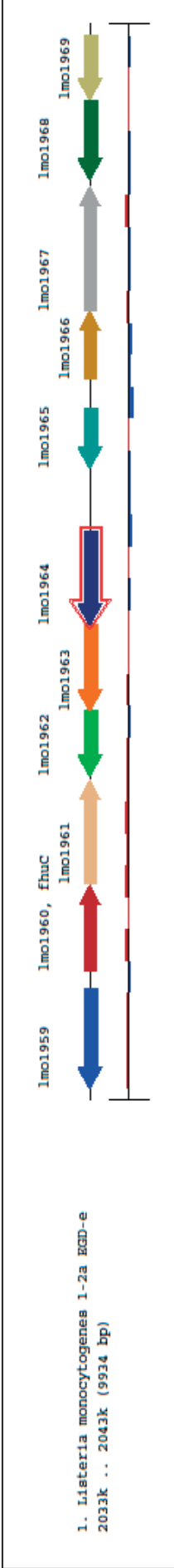
- Webb, A.J., Karatsa-Dodgson, M., and Gründling, A. (2009) Two-enzyme systems for glycolipid and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid synthesis in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 74 (2): 299–314.
- Weber, M.H., and Marahiel, M.A. (2003) Bacterial cold shock responses. *Sci Prog* 86 (Pt 1-2): 9–75.
- Weber, M.H.W., Klein, W., Müller, L., Niess, U.M., and Marahiel, M.A. (2001) Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol Microbiol* 39 (5): 1321–1329.
- Weber, M.H.W., and Marahiel, M.A. (2002) Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357 (1423): 895–907.
- Wehner, S., Mannala, G.K., Qing, X., Madhugiri, R., Chakraborty, T., Marahiel, M.A., et al. (2014) Detection of very long antisense transcripts by whole transcriptome RNA-Seq analysis of *Listeria monocytogenes* by semiconductor sequencing technology. *PLoS ONE* 9 (10): e108639.
- Weining, J., Hou, Y., and Inouye, M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* 272 (1): 196–202.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., and den Bakker, H.C. (2015) *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol* 65 (1): 286–292.
- Winkler, W.C., Cohen-Chalamish, S., and Breaker, R.R. (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (25): 15908–15913.
- Wurtzel, O., Sesto, N., Mellin, J.R., Karunker, I., Edelheit, S., Bécavin, C., et al. (2012) Comparative transcriptomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Mol Syst Biol* 8 (583).
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., et al. (2009) *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* 11 (10): 1233–1240.

10 Anhang

10.1 sRNA-Lokus und flankierende Gene ausgewählter untersuchter sRNAs

dargestellt mit GECO (<https://geco.computational.bio.uni-giessen.de/>)

*rli44*

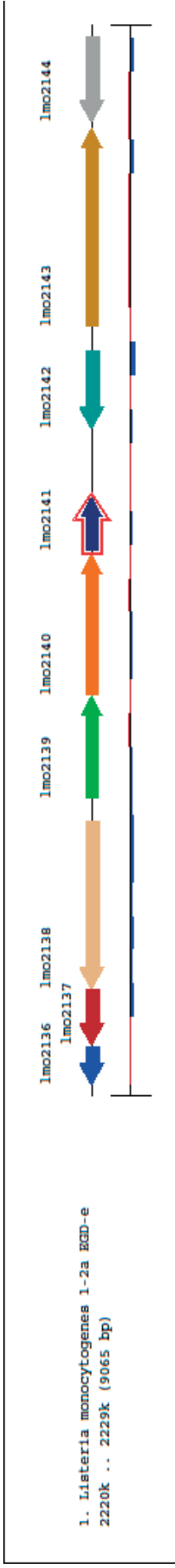


*lmo1964* ABC transporter ATP-binding protein

*lmo1965* hypothetical protein



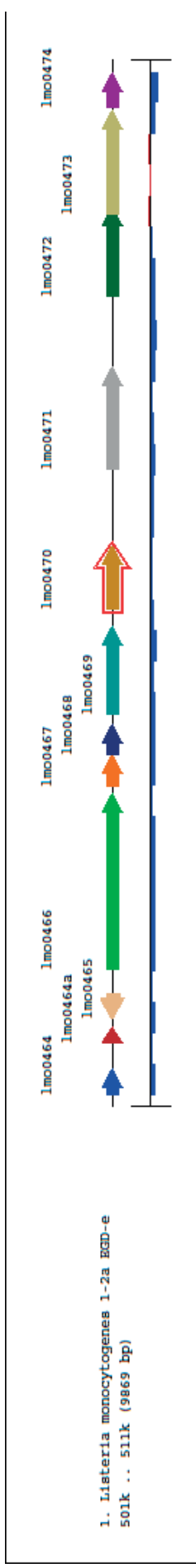
*rli47*



*lmo2141*      hypothetical protein

*lmo2142*      hypothetical protein

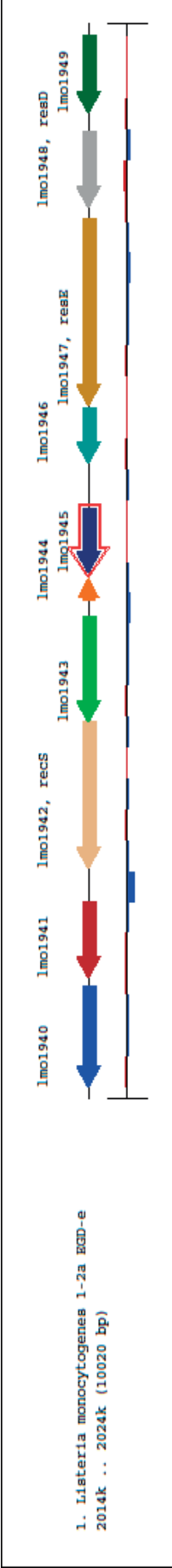
*rli78*



*lmo0470*      hypothetical protein

*lmo0471*      hypothetical protein

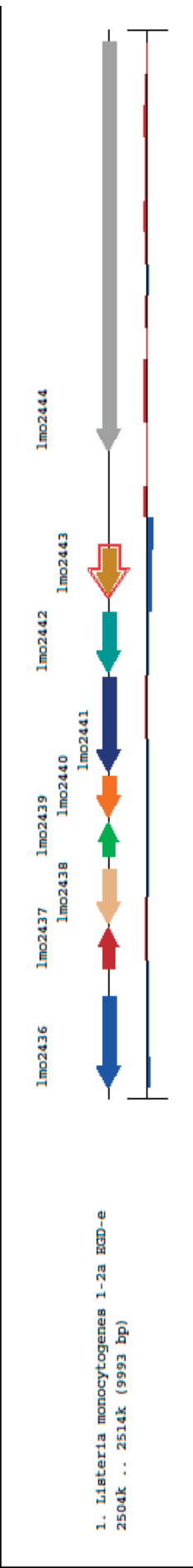
FMN



*lmo1945*      hypothetical protein

*lmo1946*      acyl-CoA hydrolase

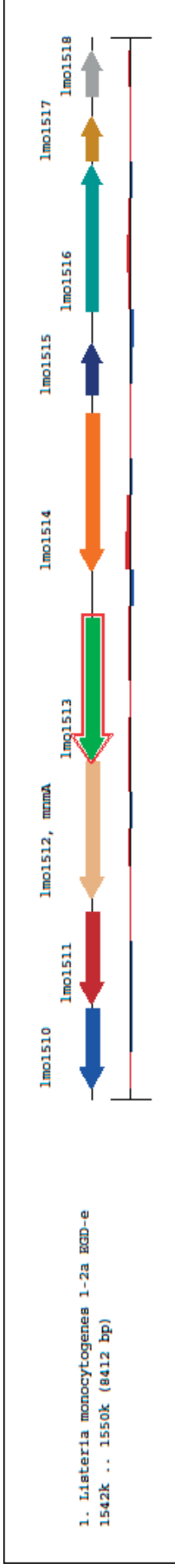
*ssrA*



*lmo2443*      hypothetical protein

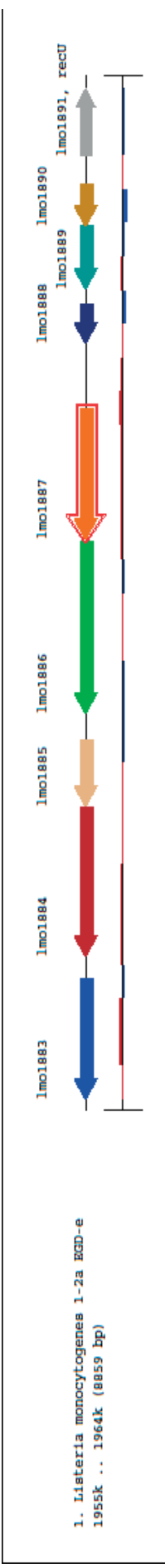
*lmo2444*      glycosidase

*ssrS*



- lmo1513* iron sulfur cofactor synthesis protein
- lmo1514* recombination factor protein RarA

*rnpB*



- lmo1887* hypothetical protein
- lmo1888* hypothetical protein

## 10.2 Target-Analyse für ausgewählte sRNAs

Gezeigt werden jeweils die 10 besten Ergebnisse für die sRNA-Sequenzen nach Mraheil et al. (Mraheil et al., 2011) und Wurtzel et al. (Wurtzel et al., 2012) mit den Programmen TargetRNA2 (Kery et al., 2014) und RNAPredator (Eggenhofer et al., 2011).

### 10.2.1 Target-Analyse mit TargetRNA2

*rli44* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	<i>polC</i>	<i>lmo1320</i>	-20.75	0.000	110	125	2	17	DNA polymerase III
2	-	<i>lmo2664</i>	-14.8	0.001	80	92	-80	-69	sorbitol dehydrogenase
3	-	<i>lmo0584</i>	-14.41	0.001	107	121	-20	-5	hypothetical protein
4	-	<i>lmo0844</i>	-14.32	0.001	36	55	-78	-60	hypothetical protein
5	-	<i>lmo0493</i>	-13.68	0.002	114	125	2	13	acylase
6	-	<i>lmo2168</i>	-13.56	0.002	114	125	2	13	glyoxalase
7	-	<i>lmo2809</i>	-13.54	0.002	111	130	-25	-5	hypothetical protein
8	<i>dnaX</i>	<i>lmo2704</i>	-13.41	0.003	106	121	-18	-2	DNA polymerase III subunit gamma/tau
9	-	<i>lmo2149</i>	-13.04	0.004	112	125	-64	-51	hypothetical protein
10	<i>rpsU</i>	<i>lmo1469</i>	-12.67	0.005	106	121	-12	5	30S ribosomal protein S21

*rli44* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	<i>polC</i>	<i>lmo1320</i>	-20.75	0.000	110	125	2	17	DNA polymerase III
2	-	<i>lmo2664</i>	-14.8	0.001	80	92	-80	-69	sorbitol dehydrogenase
3	-	<i>lmo0584</i>	-14.41	0.001	107	121	-20	-5	hypothetical protein
4	-	<i>lmo0844</i>	-14.32	0.001	36	55	-78	-60	hypothetical protein
5	-	<i>lmo0493</i>	-13.68	0.002	114	125	2	13	acylase
6	-	<i>lmo2168</i>	-13.56	0.002	114	125	2	13	glyoxalase
7	-	<i>lmo2809</i>	-13.54	0.002	111	130	-25	-5	hypothetical protein
8	<i>dnaX</i>	<i>lmo2704</i>	-13.41	0.003	106	121	-18	-2	DNA polymerase III subunit gamma/tau
9	-	<i>lmo2149</i>	-13.04	0.004	112	125	-64	-51	hypothetical protein
10	<i>rpsU</i>	<i>lmo1469</i>	-12.67	0.005	106	121	-12	5	30S ribosomal protein S21

*rli47* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	<i>ilvA</i>	<i>lmo1991</i>	-17.44	0.000	228	242	-13	2	threonine dehydratase
2	-	<i>lmo1309</i>	-14.53	0.001	58	73	-71	-57	hypothetical protein
3	-	<i>lmo1961</i>	-14.52	0.001	134	148	-61	-47	oxidoreductase
4	-	<i>lmo1680</i>	-14.01	0.002	61	76	-2	14	cystathionine gamma-synthase
5	-	<i>lmo0253</i>	-13.62	0.002	85	98	-58	-45	penicillinase antirepressor
6	-	<i>lmo0339</i>	-13.55	0.002	66	83	-66	-49	hypothetical protein
7	-	<i>lmo0038</i>	-13.08	0.004	59	73	-20	-6	agmatine deiminase
8	-	<i>lmo1323</i>	-12.89	0.004	299	309	-72	-61	hypothetical protein
9	-	<i>lmo1724</i>	-12.79	0.004	270	281	-3	9	ABC transporter ATP-binding protein
10	<i>pbpB</i>	<i>lmo2039</i>	-12.14	0.007	147	162	1	16	penicillin-binding protein 2B

*rli47* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	<i>ilvA</i>	<i>lmo1991</i>	-17.44	0.000	228	242	-13	2	threonine dehydratase
2	-	<i>lmo1309</i>	-14.53	0.001	58	73	-71	-57	hypothetical protein
3	-	<i>lmo1961</i>	-14.52	0.001	134	148	-61	-47	oxidoreductase
4	-	<i>lmo1817</i>	-14.25	0.001	357	368	-76	-65	hypothetical protein
5	-	<i>lmo1680</i>	-14.01	0.002	61	76	-2	14	cystathione gamma-synthase
6	-	<i>lmo0253</i>	-13.62	0.002	85	98	-58	-45	penicillinase antirepressor
7	-	<i>lmo0339</i>	-13.55	0.002	66	83	-66	-49	hypothetical protein
8	-	<i>lmo0038</i>	-13.08	0.004	59	73	-20	-6	agnatine deiminase
9	-	<i>lmo2374</i>	-12.95	0.004	17	29	-62	-50	aspartate kinase
10	-	<i>lmo1724</i>	-12.79	0.004	270	281	-3	9	ABC transporter ATP-binding-protein

*rli78* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	<i>frr</i>	<i>lmo1314</i>	-19.53	0.000	30	48	-27	-8	ribosome recycling factor
2	<i>ctaB</i>	<i>lmo2057</i>	-15.38	0.000	30	46	-23	-7	protoheme IX farnesyltransferase
3	-	<i>lmo0026</i>	-13.1	0.003	95	104	-79	-70	copper homeostasis protein CutC
4	-	<i>lmo1982</i>	-12.7	0.005	101	119	-80	-63	hypothetical protein
5	-	<i>lmo1149</i>	-12.37	0.006	33	48	-25	-11	alpha-ribazole-5'-phosphatase
6	-	<i>lmo2428</i>	-11.7	0.009	62	71	-3	7	cell division protein FisW
7	-	<i>lmo0266</i>	-11.66	0.009	41	49	-73	-65	transcriptional regulator
8	-	<i>lmo0471</i>	-11.66	0.009	26	37	-13	-2	hypothetical protein
9	<i>zurR</i>	<i>lmo1445</i>	-11.6	0.010	35	48	-77	-64	ZurR family transcriptional regulator
10	-	<i>lmo2108</i>	-11.46	0.010	56	71	-3	13	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase



*rli78* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	<i>frr</i>	<i>lmo1314</i>	-19.53	0.000	28	46	-27	-8	ribosome recycling factor
2	-	<i>lmo2390</i>	-17.77	0.000	250	266	-20	-3	hypothetical thioredoxine reductase
3	-	<i>lmo1601</i>	-17.17	0.000	279	292	6	19	general stress protein
4	-	<i>lmo2273</i>	-17.03	0.000	256	268	-21	-8	hypothetical protein
5	-	<i>lmo0096</i>	-15.98	0.000	277	295	-12	9	PTS mannose transporter subunit IIAB
6	-	<i>lmo0539</i>	-15.89	0.000	303	322	-69	-50	tagatose 1,6-diphosphate aldolase
7	-	<i>lmo1351</i>	-15.62	0.000	276	286	-80	-70	hypothetical protein
8	-	<i>lmo0613</i>	-15.42	0.000	294	309	2	17	oxidoreductase
9	<i>ctaB</i>	<i>lmo2057</i>	-15.38	0.000	28	44	-23	-7	protoheme IX farnesyltransferase
10	<i>rho</i>	<i>lmo2551</i>	-14.61	0.001	267	281	1	15	transcription termination factor Rho

FMN Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	-	<i>lmo1713</i>	-14.43	0.001	102	120	-67	-49	rod shape-determining protein MreB
2	<i>fruB</i>	<i>lmo2336</i>	-12.31	0.006	109	121	-68	-56	fructose-1-phosphate kinase
3	-	<i>lmo2638</i>	-9.94	0.024	104	115	-67	-56	NADH dehydrogenase
4	-	<i>lmo1595</i>	-9.58	0.029	109	123	-50	-36	hypothetical protein
5	-	<i>lmo0030</i>	-9.29	0.033	113	127	-66	-49	hypothetical protein
6	-	<i>lmo2141</i>	-8.99	0.037	109	122	7	19	hypothetical protein
7	-	<i>lmo1256</i>	-8.93	0.038	109	122	-76	-62	hypothetical protein
8	-	<i>lmo0388</i>	-8.35	0.049	114	124	-64	-54	hypothetical protein

FMN Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	-	<i>lmo1713</i>	-14.43	0.001	102	120	-67	-49	rod shape-determining protein MreB
2	<i>fruB</i>	<i>lmo2336</i>	-12.31	0.006	109	121	-68	-56	fructose-1-phosphate kinase
3	-	<i>lmo2638</i>	-9.94	0.024	104	115	-67	-56	NADH dehydrogenase
4	-	<i>lmo1595</i>	-9.58	0.029	109	123	-50	-36	hypothetical protein
5	-	<i>lmo0030</i>	-9.29	0.033	113	127	-66	-49	hypothetical protein
6	-	<i>lmo2141</i>	-8.99	0.037	109	122	7	19	hypothetical protein
7	-	<i>lmo1256</i>	-8.93	0.038	109	122	-76	-62	hypothetical protein
8	-	<i>lmo0388</i>	-8.35	0.049	114	124	-64	-54	hypothetical protein

*ssrA* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	-	<i>lmo1712</i>	-14.92	0.001	177	189	8	20	multidrug resistance protein
2	<i>minD</i>	<i>lmo1544</i>	-13.67	0.002	171	191	-9	12	septum formation inhibitor MinD
3	-	<i>lmo2450</i>	-12.54	0.005	16	27	-58	-46	carboxylesterase
4	-	<i>lmo0183</i>	-12.26	0.006	73	87	-8	7	alpha-glucosidase
5	-	<i>lmo2269</i>	-11.97	0.008	178	193	-11	5	hypothetical protein
6	-	<i>lmo1163</i>	-11.92	0.008	86	99	-13	1	carbon dioxide concentrating mechanism protein
7	-	<i>lmo1039</i>	-11.89	0.008	71	90	-26	-6	ABC transporter ATP-binding protein
8	-	<i>lmo1795</i>	-11.57	0.010	100	112	5	17	hypothetical protein
9	-	<i>lmo0756</i>	-11.35	0.011	166	180	-5	10	ABC transporter ATP-binding protein
10	-	<i>lmo1045</i>	-10.57	0.017	81	93	-32	-20	molybdopterin converting factor subunit 1

*ssrA* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	-	<i>lmo0685</i>	-16.34	0.000	347	361	-19	-5	flagellar motor protein MotA
2	-	<i>lmo1386</i>	-15.68	0.000	347	367	-20	1	DNA translocase
3	-	<i>lmo1712</i>	-14.92	0.001	161	173	8	20	multidrug resistance protein
4	<i>minD</i>	<i>lmo1544</i>	-13.67	0.002	155	175	-9	12	septum formation inhibitor MinD
5	-	<i>lmo2450</i>	-12.54	0.005	1	11	-58	-46	carboxylesterase
6	-	<i>lmo0183</i>	-12.26	0.006	57	71	-8	7	alpha-glucosidase
7	-	<i>lmo2269</i>	-11.97	0.008	162	177	-11	5	hypothetical protein
8	-	<i>lmo1163</i>	-11.92	0.008	70	83	-13	1	carbon dioxide concentrating mechanism protein
9	-	<i>lmo1039</i>	-11.89	0.008	55	74	-26	-6	ABC transporter ATP-binding protein
10	-	<i>lmo1795</i>	-11.57	0.010	84	96	5	17	hypothetical protein

*ssrS* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	-	<i>lmo0685</i>	-14.95	0.001	130	148	-24	-7	flagellar motor protein MotA
2	<i>fabD</i>	<i>lmo1808</i>	-14.34	0.001	141	154	-49	-36	ACP S-malonyltransferase
3	-	<i>lmo0573</i>	-13.52	0.003	165	183	-71	-52	hypothetical protein
4	-	<i>lmo2450</i>	-13.49	0.003	72	87	-76	-62	carboxylesterase
5	-	<i>lmo2021</i>	-13.31	0.003	30	45	5	19	hypothetical protein
6	-	<i>lmo1010</i>	-13.08	0.004	134	146	-19	-7	LysR family transcriptional regulator
7	-	<i>lmo2072</i>	-12.63	0.005	93	105	-7	7	redox-sensing transcriptional repressor Rex
8	-	<i>lmo2112</i>	-12.33	0.006	89	99	-3	8	hypothetical protein
9	-	<i>lmo2334</i>	-12.1	0.007	130	150	-18	3	transcriptional regulator
10	<i>sigB</i>	<i>lmo0895</i>	-12.03	0.007	134	149	-18	-3	RNA polymerase sigma factor sigB

*ssrS* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	-	<i>lmo0685</i>	-14.95	0.001	124	142	-24	-7	flagellar motor protein MotA
2	<i>fabD</i>	<i>lmo1808</i>	-14.34	0.001	135	148	-49	-36	ACP S-malonyltransferase
3	-	<i>lmo0573</i>	-13.52	0.003	159	177	-71	-52	hypothetical protein
4	-	<i>lmo2450</i>	-13.49	0.003	66	81	-76	-62	carboxylesterase
5	-	<i>lmo2021</i>	-13.31	0.003	24	39	5	19	hypothetical protein
6	-	<i>lmo1010</i>	-13.08	0.004	128	140	-19	-7	LysR family transcriptional regulator
7	-	<i>lmo2072</i>	-12.63	0.005	87	99	-7	7	redox-sensing transcriptional repressor Rex
8	-	<i>lmo2112</i>	-12.33	0.006	83	93	-3	8	hypothetical protein
9	-	<i>lmo2334</i>	-12.1	0.007	124	144	-18	3	transcriptional regulator
10	<i>sigB</i>	<i>lmo0895</i>	-12.03	0.007	128	143	-18	-3	RNA polymerase sigma factor sigB

*rnpB* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	<i>dnaE</i>	<i>lmo1574</i>	-13.38	0.003	10	21	-1	11	DNA polymerase III subunit alpha
2	-	<i>lmo1204</i>	-11.83	0.008	33	51	-68	-50	cobalamin biosynthesis protein CbiM
3	-	<i>lmo0346</i>	-11.53	0.010	58	72	-77	-64	triosephosphate isomerase
4	-	<i>lmo0275</i>	-10.8	0.015	9	24	-59	-43	hypothetical protein
5	<i>murE</i>	<i>lmo2038</i>	-10.46	0.018	30	42	-24	-12	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase
6	-	<i>lmo0979</i>	-10.29	0.020	11	25	-44	-31	daunorubicin resistance ATP-binding protein
7	<i>fhuC</i>	<i>lmo1960</i>	-10.17	0.021	37	50	-74	-61	ferrichrome ABC transporter ATP-binding protein
8	-	<i>lmo2589</i>	-10.02	0.023	13	21	-14	-6	TetR family transcriptional regulator
9	<i>pnpA</i>	<i>lmo1331</i>	-9.89	0.025	19	39	-48	-29	polynucleotide phosphorylase
10	-	<i>lmo1261</i>	-9.75	0.026	18	28	-76	-66	hypothetical protein



*rnpB* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	Gene	Synonym	Energy [kcal/mol]	Pvalue	sRNAstart	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop	Gene Annotation
1	-	<i>lmo1326</i>	-16.72	0.000	56	70	-80	-67	hypothetical protein
2	<i>dnaE</i>	<i>lmo1574</i>	-13.38	0.003	224	235	-1	11	DNA polymerase III subunit alpha
3	<i>dnaG</i>	<i>lmo1455</i>	-12.4	0.006	209	223	-69	-55	DNA primase
4	-	<i>lmo0346</i>	-11.53	0.010	272	286	-77	-64	triosephosphate isomerase
5	-	<i>lmo0757</i>	-11.13	0.013	56	70	-80	-66	hypothetical protein
6	-	<i>lmo0298</i>	-10.85	0.015	56	74	-65	-49	PTS beta-glucoside transporter subunit IIC
7	-	<i>lmo0275</i>	-10.8	0.015	223	238	-59	-43	hypothetical protein
8	<i>purC</i>	<i>lmo1772</i>	-10.5	0.018	60	75	-80	-64	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
9	<i>murE</i>	<i>lmo2038</i>	-10.46	0.018	244	256	-24	-12	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6 diaminopimelate ligase
10	-	<i>lmo0979</i>	-10.29	0.020	225	239	-44	-31	daunorubicin resistance ATP-binding protein

### 10.2.2 Target-Analyse mit RNA-Predator

*rli44* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	696	717	255	275	-19.48	-4.79	hypothetical protein lmo1922	<i>lmo1922</i>
2.	-8	10	73	91	-18.44	-4.35	acetyl CoA carboxylase subunit beta	<i>lmo1573</i>
3.	89	111	107	130	-17.79	-4.08	hypothetical protein lmo1340	<i>lmo1340</i>
4.	168	195	64	91	-17.39	-3.91	bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	<i>lmo1096</i>
5.	-28	-7	107	131	-16.91	-3.71	hypothetical protein lmo0106	<i>lmo0106</i>
6.	803	822	217	237	-16.66	-3.6	hypothetical protein lmo0365	<i>lmo0365</i>
7.	2	14	112	124	-16.60	-3.58	DNA polymerase III PolC	<i>lmo1320</i>
8.	-7	14	255	275	-16.56	-3.56	hypothetical protein lmo2268	<i>lmo2268</i>
9.	183	211	101	126	-16.16	-3.39	hypothetical protein lmo0520	<i>lmo0520</i>
10.	1881	1896	259	275	-15.99	-3.32	hypothetical protein lmo1226	<i>lmo1226</i>

*rli44* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	-8	10	73	91	-19.04	-4.93	acetyl CoA carboxylase subunit beta	<i>lmo1573</i>
2.	168	195	64	91	-18.68	-4.78	bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	<i>lmo1096</i>
3.	89	111	107	130	-17.78	-4.38	hypothetical protein lmo1340	<i>lmo1340</i>
4.	-28	-7	107	131	-16.92	-4.01	hypothetical protein lmo0106	<i>lmo0106</i>
5.	-29	-12	51	68	-16.74	-3.93	hypothetical protein lmo0034	<i>lmo0034</i>
6.	2	14	112	124	-16.60	-3.87	DNA polymerase III PolC	<i>lmo1320</i>
7.	183	211	101	126	-16.35	-3.76	hypothetical protein lmo0520	<i>lmo0520</i>
8.	1591	1612	46	66	-16.27	-3.73	pepidoglycan bound protein	<i>lmo0627</i>
9.	152	173	108	130	-15.46	-3.37	hypothetical protein lmo0315	<i>lmo0315</i>
10.	609	637	111	139	-15.23	-3.27	hypothetical protein lmo1013	<i>lmo1013</i>

*rli47* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	169	197	55	83	-22.44	-5.41	hypothetical protein lmo2439	<i>lmo2439</i>
2.	-69	-48	135	157	-20.30	-4.49	hypothetical protein lmo1961	<i>lmo1961</i>
3.	-17	9	195	221	-19.94	-4.34	hypothetical protein lmo2078	<i>lmo2078</i>
4.	497	523	78	106	-19.63	-4.2	hypothetical protein lmo1354	<i>lmo1354</i>
5.	376	405	280	307	-19.57	-4.18	hypothetical protein lmo1576	<i>lmo1576</i>
6.	972	998	132	161	-19.00	-3.93	hypothetical protein lmo1027	<i>lmo1027</i>
7.	2011	2028	290	308	-18.50	-3.72	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	<i>lmo2378</i>
8.	215	243	263	289	-18.14	-3.57	cobalt precorrin 6A synthase	<i>lmo1194</i>
9.	27	44	291	308	-18.09	-3.54	hypothetical protein lmo1574	<i>lmo1574</i>
10.	1091	1109	271	289	-17.82	-3.43	internalin B	<i>lmo0434</i>

*rli47* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	169	197	55	83	-21.72	-5.09	hypothetical protein lmo2439	<i>lmo2439</i>
2.	-69	-48	135	157	-20.30	-4.48	hypothetical protein lmo1961	<i>lmo1961</i>
3.	343	364	6	28	-20.15	-4.41	hypothetical protein lmo2001	<i>lmo2001</i>
4.	972	998	132	161	-19.00	-3.92	hypothetical protein lmo1027	<i>lmo1027</i>
5.	-17	9	195	221	-18.64	-3.76	hypothetical protein lmo2078	<i>lmo2078</i>
6.	1022	1041	338	357	-18.10	-3.53	hypothetical protein lmo1105	<i>lmo1105</i>
7.	-5	17	261	283	-17.21	-3.15	hypothetical protein lmo1147	<i>lmo1147</i>
8.	1228	1241	18	31	-17.18	-3.13	hypothetical protein lmo2007	<i>lmo2007</i>
9.	531	546	10	25	-17.04	-3.07	hypothetical protein lmo1340	<i>lmo1340</i>
10.	-5	17	258	281	-17.00	-3.06	hypothetical protein lmo1416	<i>lmo1416</i>

*rli78* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	481	506	19	41	-17.23	-4.64	hypothetical protein lmo1945	<i>lmo1945</i>
2.	-24	-9	31	45	-15.79	-4.01	hypothetical protein lmo1314	<i>lmo1314</i>
3.	747	772	12	37	-15.66	-3.95	hypothetical protein lmo1409	<i>lmo1409</i>
4.	263	275	34	46	-15.23	-3.76	hypothetical protein lmo0105	<i>lmo0105</i>
5.	232	250	63	82	-14.99	-3.66	hypothetical protein lmo2442	<i>lmo2442</i>
6.	397	417	56	75	-14.92	-3.63	hypothetical protein lmo0269	<i>lmo0269</i>
7.	1741	1770	8	35	-14.59	-3.49	alanyl tRNA synthetase	<i>lmo1504</i>
8.	-15	7	12	36	-14.52	-3.45	30S ribosomal protein S11	<i>lmo2607</i>
9.	107	133	39	67	-14.31	-3.36	N acetylmannosamine 6 phosphate 2 epimerase	<i>lmo2801</i>
10.	349	362	101	114	-14.21	-3.32	hypothetical protein lmo1104	<i>lmo1104</i>

*rli78* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	-22	3	244	267	-22.20	-5.42	hypothetical protein lmo2390	<i>lmo2390</i>
2.	4	32	277	306	-21.68	-5.21	hypothetical protein lmo0613	<i>lmo0613</i>
3.	81	103	259	282	-19.61	-4.38	hypothetical protein lmo1293	<i>lmo1293</i>
4.	101	124	334	357	-19.11	-4.18	cobalt transporter ATP-binding subunit	<i>lmo2600</i>
5.	783	804	142	162	-18.92	-4.1	hypothetical protein lmo1695	<i>lmo1695</i>
6.	181	201	270	291	-17.92	-3.7	anthranilate synthase component II	<i>lmo1632</i>
7.	410	431	176	196	-17.17	-3.4	hypothetical protein lmo1505	<i>lmo1505</i>
8.	561	576	252	266	-17.05	-3.35	threonine dehydratase	<i>lmo1991</i>
9.	247	264	277	296	-17.05	-3.35	hypothetical protein lmo1352	<i>lmo1352</i>
10.	-87	-70	277	296	-16.89	-3.29	hypothetical protein lmo1351	<i>lmo1351</i>

## Anhang

FMN Sequenz nach Mraheilet al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	288	305	117	134	-17.76	-3.99	hypothetical protein lmo1291	<i>lmo1291</i>
2.	183	211	12	38	-17.33	-3.8	alpha mannosidase	<i>lmo0401</i>
3.	-14	8	133	155	-17.16	-3.73	hypothetical protein lmo0140	<i>lmo0140</i>
4.	359	375	10	26	-17.03	-3.67	GTPase EngB	<i>lmo1558</i>
5.	613	625	97	109	-16.79	-3.57	histidinol dehydrogenase	<i>lmo0567</i>
6.	627	653	103	127	-16.76	-3.55	hypothetical protein lmo0915	<i>lmo0915</i>
7.	635	654	10	29	-16.64	-3.5	protein gp4	<i>lmo2298</i>
8.	757	769	28	40	-16.22	-3.32	hypothetical protein lmo1088	<i>lmo1088</i>
9.	526	541	29	44	-16.14	-3.28	3 dehydroquinase synthase	<i>lmo1927</i>
10.	-193	-174	107	129	-15.89	-3.17	hypothetical protein lmo0301	<i>lmo0301</i>



FMN Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	288	305	103	120	-18.70	-4.3	hypothetical protein lmo1291	<i>lmo1291</i>
2.	627	653	89	113	-18.08	-4.04	hypothetical protein lmo0915	<i>lmo0915</i>
3.	-191	-174	93	113	-17.20	-3.68	hypothetical protein lmo0301	<i>lmo0301</i>
4.	734	763	11	40	-16.60	-3.44	hypothetical protein lmo0757	<i>lmo0757</i>
5.	602	625	83	106	-16.25	-3.29	histidinol dehydrogenase	<i>lmo0567</i>
6.	330	341	11	22	-16.12	-3.24	hypothetical protein lmo1347	<i>lmo1347</i>
7.	220	230	12	22	-16.12	-3.24	hypothetical protein lmo1703	<i>lmo1703</i>
8.	526	541	15	30	-16.04	-3.21	3 dehydroquinase synthase	<i>lmo1927</i>
9.	225	248	12	34	-15.83	-3.12	hypothetical protein lmo0371	<i>lmo0371</i>
10.	36	46	11	22	-15.78	-3.1	hypothetical protein lmo1245	<i>lmo1245</i>

*ssrA* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	682	703	254	275	-20.61	-4.69	hypothetical protein lmo2074	<i>lmo2074</i>
2.	349	372	158	180	-19.80	-4.34	hypothetical protein lmo0642	<i>lmo0642</i>
3.	983	1007	66	90	-19.68	-4.29	hypothetical protein lmo2044	<i>lmo2044</i>
4.	597	617	14	34	-19.42	-4.18	aconitate hydratase	<i>lmo1641</i>
5.	729	750	452	473	-18.36	-3.72	hypothetical protein lmo0519	<i>lmo0519</i>
6.	989	1010	266	290	-18.31	-3.7	hypothetical protein lmo2513	<i>lmo2513</i>
7.	661	680	452	471	-18.11	-3.61	hypothetical protein lmo1395	<i>lmo1395</i>
8.	107	131	291	319	-17.60	-3.4	hypothetical protein lmo1202	<i>lmo1202</i>
9.	161	185	257	280	-17.55	-3.37	hypothetical protein lmo0413	<i>lmo0413</i>
10.	-29	-4	159	180	-17.50	-3.35	hypothetical protein lmo0961	<i>lmo0961</i>

*ssrA* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	682	703	238	259	-20.62	-4.97	hypothetical protein lmo2074	<i>lmo2074</i>
2.	349	372	142	164	-19.80	-4.62	hypothetical protein lmo0642	<i>lmo0642</i>
3.	983	1007	50	74	-19.69	-4.57	hypothetical protein lmo2044	<i>lmo2044</i>
4.	989	1010	250	274	-18.32	-3.99	hypothetical protein lmo2513	<i>lmo2513</i>
5.	107	131	275	303	-17.56	-3.67	hypothetical protein lmo1202	<i>lmo1202</i>
6.	161	185	241	264	-17.55	-3.66	hypothetical protein lmo0413	<i>lmo0413</i>
7.	-29	-4	143	164	-17.50	-3.64	hypothetical protein lmo0961	<i>lmo0961</i>
8.	160	174	62	76	-17.42	-3.61	hypothetical protein lmo2760	<i>lmo2760</i>
9.	-131	-115	236	252	-16.78	-3.33	2 C methyl D erythritol 2,4 cyclodiphosphate synthase	<i>lmo0236</i>
10.	1236	1261	250	278	-16.55	-3.23	hypothetical protein lmo2362	<i>lmo2362</i>

*ssrS* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	230	257	69	94	-21.27	-5.83	glucose inhibited division protein B	<i>lmo2802</i>
2.	754	779	70	92	-19.99	-5.24	hypothetical protein lmo0298	<i>lmo0298</i>
3.	222	239	73	92	-18.79	-4.68	hypothetical protein lmo0717	<i>lmo0717</i>
4.	753	769	126	142	-16.98	-3.84	hypothetical protein lmo2850	<i>lmo2850</i>
5.	360	382	106	130	-16.75	-3.74	agmatine deiminase	<i>lmo0038</i>
6.	-52	-29	67	87	-16.29	-3.52	2 isopropylmalate synthase	<i>lmo1987</i>
7.	84	107	48	74	-15.92	-3.35	heat shock protein HtpX	<i>lmo0963</i>
8.	337	366	85	112	-15.87	-3.33	hypothetical protein lmo1948	<i>lmo1948</i>
9.	1038	1053	127	142	-15.83	-3.31	hypothetical protein lmo2105	<i>lmo2105</i>
10.	53	79	63	87	-15.68	-3.24	DNA topoisomerase III	<i>lmo2756</i>

*ssrS* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	230	257	63	88	-21.27	-5.79	glucose inhibited division protein B	<i>lmo2802</i>
2.	754	779	64	86	-19.99	-5.2	hypothetical protein lmo0298	<i>lmo0298</i>
3.	222	239	67	86	-18.79	-4.65	hypothetical protein lmo0717	<i>lmo0717</i>
4.	753	769	120	136	-16.98	-3.82	hypothetical protein lmo2850	<i>lmo2850</i>
5.	360	382	100	124	-16.75	-3.71	agmatine deiminase	<i>lmo0038</i>
6.	-52	-29	61	81	-16.29	-3.5	2 isopropylmalate synthase	<i>lmo1987</i>
7.	84	107	42	68	-15.92	-3.33	heat shock protein HtpX	<i>lmo0963</i>
8.	337	366	79	106	-15.87	-3.31	hypothetical protein lmo1948	<i>lmo1948</i>
9.	1038	1053	121	136	-15.83	-3.29	hypothetical protein lmo2105	<i>lmo2105</i>
10.	53	79	57	81	-15.68	-3.22	DNA topoisomerase III	<i>lmo2756</i>

*rnpB* Sequenz nach Mraheil et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	-152	-129	3	28	-16.03	-3.38	pyrroline 5 carboxylate reductase	<i>lmo0396</i>
2.	-165	-140	156	182	-15.68	-3.23	hypothetical protein lmo1431	<i>lmo1431</i>
3.	818	841	2	26	-15.60	-3.19	2 isopropylmalate synthase	<i>lmo1987</i>
4.	626	639	61	74	-15.44	-3.13	pyruvate phosphate dikinase	<i>lmo1867</i>
5.	326	340	159	173	-15.25	-3.04	hypothetical protein lmo1210	<i>lmo1210</i>
6.	4312	4329	165	181	-15.22	-3.03	hypothetical protein lmo1734	<i>lmo1734</i>
7.	697	718	157	178	-15.21	-3.03	hypothetical protein lmo0439	<i>lmo0439</i>
8.	24	53	150	178	-15.04	-2.95	hypothetical protein lmo1146	<i>lmo1146</i>
9.	-31	-17	60	74	-14.98	-2.93	hypothetical protein lmo0658	<i>lmo0658</i>
10.	550	561	13	24	-14.93	-2.91	hypothetical protein lmo2599	<i>lmo2599</i>

*rnpB* Sequenz nach Wurtzel et al.

Rank	mRNA start	mRNA stop	sRNA start	sRNA stop	Energy [kJ/mol]	Z-Score	Gene Annotation	Locus Tag
1.	1190	1216	37	63	-19.20	-4.12	glutamate dehydrogenase	<i>lmo0560</i>
2.	-177	-154	197	218	-18.56	-3.87	hypothetical protein lmo1909	<i>lmo1909</i>
3.	668	691	96	119	-17.15	-3.32	ferrochelatase	<i>lmo2211</i>
4.	818	843	214	240	-16.80	-3.19	2 isopropylmalate synthase	<i>lmo1987</i>
5.	550	561	227	238	-16.40	-3.03	hypothetical protein lmo2599	<i>lmo2599</i>
6.	1292	1311	96	115	-16.33	-3	hypothetical protein lmo0184	<i>lmo0184</i>
7.	-174	-145	183	211	-16.33	-3	50S ribosomal protein L32	<i>lmo0486</i>
8.	-152	-129	217	242	-16.25	-2.97	pyrroline 5 carboxylate reductase	<i>lmo0396</i>
9.	341	370	175	201	-16.20	-2.95	hypothetical protein lmo0152	<i>lmo0152</i>
10.	110	127	175	192	-16.15	-2.93	hypothetical protein lmo1762	<i>lmo1762</i>

## 11 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



## 12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung während der gesamten Promotion.

Herrn PD Dr. Dieter Glebe danke ich für die Zweitbetreuung im Rahmen des Prägraduiertenkollegs.

Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn PD Dr. Torsten Hain und Herrn Dr. Mobarak Abu Mraheil danke ich für die Betreuung, die engagierte Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen.

Danken möchte ich ebenso allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, ganz besonders Alexandra Amend und Nelli Schklarenko, die mich im Labor eingearbeitet haben und mir bei Problemen mit den Experimenten immer mit Tipps zur Seite standen.

Meinen Mitdoktoranden, allen voran Gopala Mannala und Renate Frantz, danke ich für den fachlichen Austausch und die gemeinsame Zeit in und außerhalb des Labors.

## 13 Lebenslauf



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6511-9



9 78 3 835 119 651 19